

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Ivana Černajová

Lichenofágia na pozadí sekundárnych metabolitov

Mollusc grazing and secondary metabolites of lichens

Diplomová práce

Školitel: RNDr. David Svoboda, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 6. 5. 2013

Podpis

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí v prvom rade školiteľovi D. Svobodovi za všeobecnú podporu počas riešenia práce a za chuť a ochotu vôbec sa do tejto témy púšťať. Za inšpiratívne prostredie ďakujem aj všetkým ďalším členom lichenologickej skupiny – Z. Palicemu, L. Syrovátkovej, F. Boudovi, O. Peksovi a J. Steinovej, špeciálne však J. Malíčkoví za zasvätenie do rôznych techník a ochotu kedykoľvek pomôcť s akýmkoľvek problémom. O. Koukolovi ďakujem za vedenie poseminárov a prínosné rady. Ďakujem L. Juříčkovej za konzultácie v počiatočných štádiách riešenia práce, Ing. D. Blanárovi za cenné rady pri žiadosti o povolenie na výskum na území NP Muránska Planina a M. Weiserovi za pomoc s Hotellingovým T testom. Moja vďaka patrí katedre botaniky PřF UK za praktické zázemie a GA UK za finančnú podporu. V poslednom rade ďakujem svojim rodičom za všestrannú podporu počas celého štúdia.

Abstrakt

V porovnaní s herbivóriou a množstvom znalostí o jej dôsledkoch, je lichenofágia málo preskúmaným javom, ktorému sa začína venovať viac pozornosti až v posledných rokoch. Množstvo recentných prác potvrdilo, že sekundárne metabolity chránia lišajníky voči viacerým skupinám živočíchov a vznikli rôzne teórie o charaktere týchto interakcií. Okrem toho niekoľko publikovaných prác načrtlo významné ekologické dôsledky lichenofágie. Vo svojej diplomovej práci som sa zamerala na problematiku sekundárnych metabolitov a prirodzené preferencie spásačov medzi jednotlivými druhmi lišajníkov. Na laboratórne pokusy som si vybrala šesť epifytických lišajníkov obsahujúcich sekundárne metabolity (*Parmelia sulcata*, *P. saxatilis*, *Parmelina tiliacea*, *Melanelixia glabratula*, *M. subaurifera*, *M. glabra*), dva bez metabolitov (*Melanohalea exasperata*, *M. exasperatula*) a dva druhy slimákov (*Lehmannia marginata*, *Cochlodina cerata*), ktoré sa epifytickými lišajníkmi reálne živia. Pomocou tenkovrstvej chromatografie som overila sekundárne metabolity v stielkach vybraných druhov a ich obranná rola voči mäkkýšom bola v pokusoch preukázaná. Následne som zostavila transplantačný pokus, v ktorom som sledovala preferencie prirodzených spásačov v prirodzených podmienkach. V pokuse bol rod *Melanohalea*, ktorý neobsahuje sekundárne metabolity, značne preferovaný. Medzi zvyšnými dvomi transplantovanými druhmi (*P. sulcata* a *M. glabratula*) sa miera spásania nelíšila. Výsledky naznačujú, že okrem sekundárnych metabolitov sú za preferencie spásačov zodpovedné aj iné faktory, ako napr. štruktúra stielky. Ďalej z pokusu vyplýva, že predачný tlak na epifytické lišajníky je intenzívny. Je preto na mieste uvažovať o jeho ekologických a evolučných dôsledkoch.

Abstract

In contrast to the much that is known about herbivory and its consequences, lichenovory has seldom been studied. Recently, studies confirming the anti-feedant role of lichen secondary metabolites were brought out and hypotheses considering the nature of these interactions were introduced. Also, a few papers dealing with the ecological consequences of lichenovory were published lately. My thesis was aimed on the secondary metabolites issue and the preferences of the lichen feeders in the natural conditions. Six epiphytic lichen species containing secondary compounds (*Parmelia sulcata*, *P. saxatilis*, *Parmelina tiliacea*, *Melanelixia glabratula*, *M. subaurifera*, *M. glabra*), two without them (*Melanohalea exasperata*, *M. exasperatula*) and two species of gastropods that naturally climb the trees to feed on lichens (*Lehmannia marginata*, *Cochlodina cerata*) were selected for grazing experiments. The deterring role of the lichen compounds was proven. These were also identified using thin-layer chromatography. Subsequently, a transplantation experiment was carried out. It was focused on specifying the preferences of lichen grazers in their natural habitat. The genus *Melanohalea* that does not contain any secondary metabolites was strongly preferred. No significant preferences among the other species used in the experiment (*P. sulcata* a *M. glabratula*) were found. The results indicate that in addition to secondary metabolites there are other factors influencing the palatability of lichens, for example thallus structure. Furthermore the predation pressure was quite intensive. Thus it seems reasonable to consider the ecological and evolutionary consequences of lichenovory.

Obsah

1. ÚVOD	7
1.1 Poznámky k používanému jazyku	7
1.2 Lišajníky a živočíchy	7
1.2.1 Sekundárne metabolity	8
1.2.2 Metodický prístup k štúdiu funkcií sekundárnych metabolitov	8
1.2.3 Význam sekundárnych metabolitov	10
1.2.4 Antihebrivórne účinky	11
1.2.5 Preferencie medzi druhmi	12
1.2.6 Preferencie v rámci stielky	13
1.2.7 Ekologické dôsledky	14
1.3 Ciele práce	15
1.4 Vybrané organizmy	16
1.5 Použité skratky	19
2. MATERIÁL A METÓDY	20
2.1 Materiál	20
2.2 TLC	21
2.3 Laboratórne pokusy	22
2.3.1 Príprava lišajníkov	22
2.3.2 Príprava slimákov	23
2.3.3 Dizajn pokusu	23
2.3.4 Ukončenie pokusu	24
2.3.6 Štatistické spracovanie	25
2.4 Transplantačný pokus	26
2.4.1 Príprava pokusu	26
2.4.2 Lokality	26
2.4.3 Založenie pokusu a meranie charakteristík prostredia	27
2.4.4 Ukončenie pokusu	28
2.4.5 Vyhodnotenie	29
2.4.6 Štatistické spracovanie	29
3. VÝSLEDKY	31
3.1 TLC	31
3.2 Laboratórne pokusy	31
4. DISKUSIA	49
4.1 TLC	49
4.2 Vymývanie sekundárnych metabolitov acetónom	49
4.3 Vyhodnocovanie pokusov	49
4.4 Ochranná rola sekundárnych metabolitov	50
4.5 Index ochrany a preferencie	52
4.6 Transplantačný pokus	52
4.7 Preferencie v transplantačnom pokuse	53
4.8 Ekologické dôsledky lichenofágie	54
5. ZÁVER	56
6. LITERATÚRA	57
7. PRÍLOHY	63

1. ÚVOD

1.1 Poznámky k používanému jazyku

Na úplný začiatok by som rada uviedla pár poznámok k jazyku používanému v práci. V prvom rade sa v práci vyhýbam slovu herbivória, ktoré sa jednoznačne vzťahuje k rastlinám a tými lišajníky nie sú. Miesto toho používam slovo „lichenofágia“, tak ako je ustálená mykofágia. Ako preklad anglických slov „feeding“ a „grazing“ používam spásanie. Aj podľa Begona et al. (1997) je spásanie ekologický termín, ktorý vlastne znamená herbivóriu, teda taký typ predácie, kedy predátor za svoj život napadne veľké množstvo koristi, z ktorej väčšinou skonzumuje len časť. Z toho sú odvodené aj slová lichenofág a spásač namiesto slova herbivor. Na vyjadrenie „škody“, ktorú spásači spôsobujú na stielkach používam slovo obžer, podľa slova žer, ktoré sa používa na aktivity škodného hmyzu a mäkkýšov v lesníckej literatúre (napr. Zúbrik et al. 2008). Toto slovo vyznieva trochu zvláštne, bohužiaľ je asi najvýstižnejšie, keďže v slovenčine neexistuje ekvivalent českého „požerek“. Slová obrana a ochrana používam ako synonymá.

Všetky mená lišajníkov v práci boli zjednotené podľa Index Fungorum (indexfungorum.org).

1.2 Lišajníky a živočíchy

Interakcie medzi lišajníkmi a živočíchmi sa študujú už viac než sto rokov. Napriek nesmiernej zaujímavosti ostávala problematika po väčšinu času prevažne marginálnou témou, snád s výnimkou sobov. V posledných rokoch však táto téma, ktorá poskytuje obrovské množstvo možností k bádaniu, dostáva viac zaslúženej pozornosti.

Medzi známe typy interakcií patrí poskytovanie potravy, úkrytu (Baur & Baur 1997 – *B. perversa* a *X. parietina*) alebo stavebného materiálu na hniezda vtákov (Richardson & Young 1977) a naopak napríklad rozširovanie lišajníkov alebo napomáhanie ich rozkladu živočíchmi (Gerson & Seaward 1977). Okrem toho sú známe prípady kryptického sfarbenia, kedy rôzne článkonožce svojim sfarbením napodobňujú povrch lišajníku. Zaujímavé je, že podobné mimikry sú známe aj medzi stavovcami, ako napríklad severoamerická žaba *Hyla versicolor* alebo salamandra *Aneides aeneus* (Richardson & Young 1977).

Najznámejším príkladom trofických vzťahov sú soby (*Rangifer tarandus*), ktorých hlavnou zložkou zimnej potravy sú lišajníky rodu *Cladonia* (Richardson & Young 1977). Dôležitú zložku zimnej potravy tvoria aj u iných jeleňovitých, napr. *Odocoileus hemionus* a *Cervus canadensis*. Aj ďalšie cicavce sa aspoň príležitostne živia lišajníkmi, napr. lumíky, svišť *Marmota caligata* (Richardson & Young 1977) a hrzdiak lesný (*Myodes glareolus*) (Nybakken et al. 2010). Prekvanpením pre nás môže byť opica *Rhinopithecus bieti* (Colobinae), endemická pre Čínu, ktorá sa z veľkej časti živí práve lišajníkmi (Kirkpatrick et al. 2001). Nie je známe, že by sa lišajníkmi živili aj vtáky, avšak lišajníky môžu ovplyvňovať ich potravu nepriamo. A to tak, že poskytujú úkryt bezstavovcom, ktorými sa živia. V prípade

redukcie lišajníkov, napr. z dôvodu znečistenia, tak môže výrazne poklesnúť populácia koristi vtákov (Richardson & Young 1977). Z bezstavovcov sa lišajníkmi živia hlavne ulitníky (Gastropoda) a rôzne skupiny článkonožcov (Artropoda), napr. mole (Lepidoptera), roztoče (Acari) (Gerson & Seaward 1977), chvostoskoky (Collembola), vidličiariky (Diplura) alebo pavši (Psocoptera) (Lücking & Bernecker-Lücking 2000).

Vo svojej diplomovej práci som sa zaoberala lichenofágiou zo strany mäkkýšov, preto v tejto kapitole uvediem problematiku interakcií medzi bezstavovcami a lišajníkmi z dostupnej literatúry. Stavovcom sa ďalej venovať nebudem.

1.2.1 Sekundárne metabolity

Jedným z pomerne často skúmaných problémov v súvislosti s konzumáciou lišajníkov je úloha ich sekundárnych metabolitov. Syntetizuje ich mykobiont askolišajníkov. Ukladajú sa vo forme kryštálov na vonkajšej strane hýf a sú nerozpustné vo vode (Elix & Stocker-Wörgötter 2008). U bazidiolišajníkov tvorba týchto látok nie je známa (Culberson 1969).

V dnešnej dobe poznáme štruktúru až 1050 rôznych zlúčenín (Solhaug & Gauslaa 2012), z ktorých sa len malé množstvo (50-60) vyskytuje aj v iných hubách alebo v cievnatých rastlinách, ostatné sú unikátne pre lišajníky (Elix & Stocker-Wörgötter 2008). Jedným z najcharakteristickejších znakov týchto látok je vysoký pomer fenolov zložených z dvoch alebo troch benzénových jadier spojených esterifikáciou alebo éterifikáciou alebo obomi. Týmito mechanizmami vznikajú depsidy, depsidony, dibenzofurany, kyselina usnová a kyselina pikrolichenová, ktoré sa vyskytujú výlučne v lišajníkoch. Ďalšie charakteristické aromatické látky - chromony, xanthony a antrachinony - sú často identické s produktmi nelichenizovaných húb alebo vyšších rastlín, alebo sú ich deriváty s len malou odchýlkou (Culberson 1969).

Tieto látky pochádzajú z troch hlavných biosyntetických dráh. V tabuľke 1 podľa Elix & Stocker-Wörgötter (2008) sú uvedené hlavné skupiny metabolitov, rozdelené podľa pravdepodobnej dráhy, príklady a v zátvorke počet zlúčenín so známou štruktúrou.

1.2.2 Metodický prístup k štúdiu funkcií sekundárnych metabolitov

Ako som už uviedla vyššie, sekundárne metabolity sa v lišajníkoch vyskytujú vo forme extracelulárnych kryštálov. Z praktického hľadiska je to veľká výhoda, pretože ich je možné zo stielky jednoducho extrahovať pomocou acetónu. Keďže sekundárne metabolity sú dôležitým znakom v taxonómii a systematike lišajníkov, extrakcia látok a ich následná identifikácia je často užitočná či dokonca nevyhnutná pri určovaní lišajníkov. Mnohé morfológicky podobné druhy sa rozlišujú práve na základe prítomnosti alebo neprítomnosti určitých látok. Napr. *Physcia aipolia* sa od podobnej *P. stellaris* bezpečne odlíši na základe prítomnosti zeorinu (Smith et al. 2009). Výnimočne sú sekundárne metabolity charakteristické pre vyššie taxonomické skupiny, napr. pre čeľaď *Teloschistaceae* je typická prítomnosť antrachinonov (Elix & Stocker-Wörgötter 2008).

1. Acetyl-polymalonyl pathway
 - 1.1.Secondary aliphatic acids, esters, and derivates (45)
 - protolicheterinic, roccellic acid
 - 1.2.Polyketide derived aromatic compounds
 - 1.2.1. Mononuclear phenolic compounds (19)
 - orsellinic acid
 - 1.2.2. Di- and tri-aryl derivates of simple phenolic units
 - a. Depsides, tridepsides, benzyl esters (185)
 - lecanoric acid, alectorialic acid, gyrophoric acid
 - b. Depsidones and diphenyl ethers (112)
 - virensic, micareic acid
 - c. Depsones (6)
 - picrolichenic acid
 - d. Dibenzofurans, usnic acid and derivates (23)
 - didymic acid, usnic acid
 - 1.2.3. Anthraquinones and biogenetically related xanthenes (56)
 - 1.2.4. Chromones (13)
 - 1.2.5. Naphthaquinones (4)
 - 1.2.6. Xanthenes (44)
2. Mevalonic acid pathway
 - 2.1.Di-, sester- and triterpenes (70)
 - Retigeranic acid, zeorin
 - 2.2.Steroids (41)
 - ergosterol
3. Shikimic acid pathway
 - 3.1.Terphenylquinones (2)
 - Polyporic acid, thelephoric acid
 - 3.2.Pulvinic acid derivates (12)
 - Pulvinic dilactone, calycin

Tab 1 Hlavné skupiny sekundárnych metabolitov lišajníkov, pravdepodobné biosyntetické dráhy a príklady, v zátvorke počet látok v skupine so známou štruktúrou. Prevzaté z Elix & Stocker-Wörgötter (2008).

Ďalšia vlastnosť extrakcie látok acetónom, ktorá sa ukazuje ako veľmi praktická, je fakt, že ak je obsah vody v stielke lišajníku pod kritickou hodnotou pre fotosystém II, acetón neznižuje životaschopnosť lišajníkov (Solhaug & Gauslaa 2001, Solhaug & Gauslaa 1996). Len vďaka tomu je možné experimentálne testovať ekologické role lišajníkových látok. Umožňuje nám to odstrániť z lišajníku metabolity a porovnávať stielky so zníženým obsahom metabolitov s normálnymi, kontrolnými. Lišajník je totiž po opätovnej rehydratácii schopný obnoviť všetky svoje vitálne fyziologické funkcie (Solhaug & Gauslaa 2001, Lange et al. 1997). Tento prístup sa bežne používa v ekologických pokusoch a vo svojej diplomovej práci som ho využila tiež (viď ďalej).

Efektivita extrakcie látok sa u rôznych druhov lišajníkov a pre rôzne látky líši (McEvoy et al. 2006, Solhaug & Gauslaa 2001). V niektorých prípadoch, napr. *Xanthoria parietina*, (Solhaug & Gauslaa 1996) je možné látky dokonale extrahovať do niekoľkých hodín ponorenia v acetóne. V prípade *Diploschistes muscorum* acetón odstráni až do 90 % pôvodného obsahu látok za 4×5 minút. U iných (napr. *Lobaria pulmonaria*) to pred prekročením limitu znášanlivosti acetónu nedosiahneme (Solhaug & Gauslaa 2001). Táto metóda sa však bežne (a úspešne) v ekologických pokusoch používa (napr. Ranković et al. 2009, Pöykkö et al. 2005, Gauslaa 2005, Hyvärinen et al. 2000, Reutiman & Scheidegger 1987, Whiton & Lawrey 1984, Lawrey 1983), takže zníženie obsahu metabolitov je dostatočne významné na dokázanie ich prípadnej odpudivosti na živočíchy alebo iných funkcií.

1.2.3 Význam sekundárnych metabolitov

Je viac než pravdepodobné, že lišajníkové látky, ktoré sa vyvinuli vo veľkom množstve skupín lichenizovaných húb, majú určitý adaptívny význam. Inak by ich relatívna energetická náročnosť viedla v evolučnom čase k ich zániku (Lawrey 1986). Dnes už existuje množstvo dôkazov o rôznych biologických funkciách lišajníkových látok, často sú však protikladné. Aktuálne poznatky aspoň z určitého okruhu funkcií zhrnuli napr. Solhaug & Gauslaa (2012), Huneck (1999) a Lawrey (1986).

Samotný fakt, že tieto metabolity sú charakteristické pre lišajníky a že izolované hubové kultúry nie sú schopné ich produkcie našepkáva, že by mohli mať význam práve pre udržanie symbiózy (Lawrey 1986). Aj keď, ako som už spomenula, nie všetky lišajníky ich produkujú. Medzi ich možné funkcie, súvisiace s udrжанím symbiózy, patrí okrem iného regulácia aktivity fotobionta (Lawrey 1986). Napr. kyselina usnová zásadne ovplyvňuje fyziologické vlastnosti symbiotickej riasy *Trebouxia*, imobilizuje jej pohyblivé štádiá, ovplyvňuje respiráciu a zvyšuje permeabilitu membrán (Kinraide & Ahmadjian 1970). Zvyšovanie permeability membrán je jedným z dôsledkov inaktivácie ureázy, enzýmu regulujúceho výmenu organických látok medzi symbiontami, práve kyselinou usnovou (Vicente et al. 1978).

Ďalšou navrhovanou fyziologicky významnou funkciou lišajníkových látok je zlepšovanie výmeny plynov vďaka ich hydrofóbnosti (Solhaug & Gauslaa 2012). V svojich pokusoch Souza-Egipsy et al. (2000) po nasprejovaní vody na lišajníky pozorovali extracelulárnu vodu v acetóne vymytých stielkach *Neofuscelia pokornyi*, *Xanthoparmelia pulla* a *Xanthoria parietina*, na rozdiel od stielok normálnych, v ktorých žiadnu vodu v mimobukových priestoroch nezaznamenali. Lange et al. (1997) však nenašli žiadny rozdiel vo vzťahu fotosyntézy s obsahom vody v stielke medzi prirodzenými stielkami *Diploschistes muscorum* a stielkami bez metabolitov.

Sekundárne metabolity môžu často byť prostriedkom interakcií medzi lišajníkmi alebo medzi lišajníkmi a inými organizmami. Experimentálne bolo dokázané, že niektoré lišajníkové látky inhibujú klíčenie spór iných lišajníkov (Whiton & Lawrey 1982), machov (Lawrey 1977) a húb (Land & Lungström 1998). Účinok však okrem abiotických podmienok (Gardner & Mueller 1981) závisí aj na konkrétnom druhu lišajníku (Land & Lungström 1998, Whiton & Lawrey 1984, Whiton & Lawrey 1982). Inhibícia mykorhíznych húb tak môže byť formou

kompetície s vyššími rastlinami (Henningson & Lungström 1970). Okrem toho majú lišajníkové látky aj antibakteriálne účinky (Neeraj et al. 2011, Ranković et al. 2009).

Existujú však aj protichodné názory. Lawrey (1997) napríklad zistil, že parazitická lichenikolná huba *Hobsoniopsis santessonii* rozkladá pletivo stielok *Peltigera* menej efektívne ako sú z neho vymyté sekundárne metabolity. Ani pôdna mikrobiota sa nezdá byť negatívne ovplyvnená látkami z terrikolnej *Cladonia stellaris*, naopak je možné, že ich je schopná využívať ako zdroj uhlíka (Stark & Hyvärinen 2002).

Ďalšou dôležitou vlastnosťou sekundárnych metabolitov je ich schopnosť vytvárať komplexy s kationmi kovov. Lišajníky sa tak podieľajú na zvetrávaní hornín (napr. Ascaso et al. 1976), čo potvrdilo niekoľko štúdií rozhraní lišajník/hornina. Napríklad kyselina squamatová z *Cladonia squamata* viaže kationy železa (Williams & Rudolph 1974), *Xanthoria elegans*, *Lecidea lapicida*, *Rhizocarpon geographicum* a *Bacidia stipata* zvetrávajú vulkanické horniny (Ascaso et al. 1990) a *Ochrolechia parella* mafické horniny, pravdepodobne prostredníctvom kyseliny šťavelovej (Adamo et al. 1993). Úlohu kyseliny šťavelovej pri zvetrávaní hornín potvrdili aj Arocena et al. (2003).

Napriek nesporným experimentálnym dôkazom o význame lišajníkových látok pri zvetrávaní hornín a ich alelopatických účinkoch je len veľmi ťažké si predstaviť ich reálne dopady v prírode. Protiargument je prostý – ako som už spomenula, tieto látky sú takmer nerozpustné vo vode. Iskanaar & Syers (1971) na základe testovania 10 látok stanovili rozpustnosť na 5 až 57 mg/l (pre porovnanie rozpustnosť NaCl pri rovnakých podmienkach je 360 g/l). Podľa autorov je rozpustnosť však dostatočná na to, aby vytvárali komplexy s kovmi a prispievali tak k zvetrávaniu hornín. Otázkou zostáva, či je dostatočná aj v biotických interakciách, tak ako to opísal napr. Votintseva (2007), ktorý pozoroval, že plodnice *Fomes fomentarius* a *Fomitopsis pinicola* sa tvoria len na kmeňoch s nižšou pokryvnosťou machov a lišajníkov a to čo najďalej od ich stielok.

Za jednu z najlepšie preskúmaných funkcií kortikálnych lišajníkových látok a pigmentov možno považovať ochranu pred nadmerným žiarením a UV. Túto problematiku recentne podrobne zhrnuli Solhaug & Gauslaa (2012), preto sa jej nebudem na tomto mieste venovať.

1.2.4 Antihebrivórne účinky

Potenciálnou rolou sekundárnych metabolitov lišajníkov pri odpudzovaní predátora sa zaoberali už Zukal (1895) a Zopf (1896). Ich závery si však navzájom odporovali (ale treba mať na pamäti, že pri pokusoch použili iné druhy slimákov aj lišajníkov). Stahl (1904) potvrdil Zukalovu domnienku, že horká chuť sekundárnych metabolitov lichenofágov odrádza. Ďalšie štúdie sú (podľa mojich znalostí) publikované až od osemdesiatych rokov minulého storočia. Mnohé z nich potvrdzujú negatívne účinky (niektorých) týchto látok voči článkonožcom alebo mäkkýšom. Charakter obrany bol skúmaný z rôznych uhl'ov pohľadu.

Kyselina usnová a kyselina vulpínová v strave larvy polyfágnej mory *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) spôsobuje spomalenie rastu, predĺženie larválneho štádia alebo dokonca až smrť (Emerich et al. 1993). Atranorin, kalycin, kyseliny oxyphysodová,

fumarprotocetrarová a norstiktová, ale ani vulpínová v nižších koncentráciách nezapríčiňujú mortalitu lariev, významne však spomaľujú ich rast. Rovnako pôsobí aj parietin (Giez et al. 1994). Kyselina stiktová žiadne podobné účinky nemá (Emerich et al. 1993).

Ani larvy ďalšieho motýlieho rodu *Eilema* (Lepidoptera, Arctiidae) neprežijú ak ich stravu tvoria *Vulpicida pinastri* a *Hypogymnia physodes* (Pöykkö et al. 2005, Pöykkö & Hyvärinen 2003), efekt sa stráca, ak sa z lišajníkov odstráni sekundárne metabolity (Pöykkö et al. 2005). Naopak na *Melanohalea exasperata* a *Xanthoria parietina* larvy prežívajú (Pöykkö & Hyvärinen 2003). *Parmelia sulcata* tiež larvy neusmrcuje, spomaľuje však ich rast (Pöykkö et al. 2005). V preferenčnom pokuse larvy jednoznačne uprednostňujú *M. exasperata* (Pöykkö & Hyvärinen 2003).

Neexistujú dôkazy, že by lišajníkové látky boli toxické aj pre mäkkýše. Napriek tomu ich odpudzujú, pravdepodobne kvôli horkej chuti. Napr. Gauslaa (2005) pozoroval výrazné zvýšenie konzumácie slimákom meňavým (*Cepaea hortensis*, cz: páskovka keřová) 14 zo 17 lišajníkov po redukcii sekundárnych metabolitov. Všetkých 14 druhov patrilo do čeľade *Parmeliaceae*. Podľa autorov je teda možné, že zatiaľ čo *Parmeliaceae* si vytvorili ochranu v podobe sekundárnych metabolitov, u iných skupín to môže byť inak – napr. *Anaptychia runcinata* (*Physciaceae*) bola aj po vymytí látok stále dobre chránená (Gauslaa 2005).

1.2.5 Preferencie medzi druhmi

Z početných pozorovaní a pokusov je jasné, že spásanie lišajníkov nie je náhodné. Spásači si vyberajú medzi jednotlivými druhmi lišajníkov, ale aj medzi časťami jednej stielky. Za tieto preferencie sú dosť často zodpovedné práve sekundárne metabolity.

Ulitník *Pallifera varia* uprednostňuje druhy s nízkym obsahom esenciálnych prvkov (N, P, Ca), ktoré majú zároveň nízku koncentráciu ochranných látok (*Aspicila gibbosa*, *Lasallia papulosa*), oproti druhom výživnejším, ale lepšie chráneným (*Flavoparmelia baltimorensis*, *Xanthoparmelia cumberlandia*) („avoidance hypothesis“ Lawrey 1983).

Ďalšie práce na podporu tejto hypotézy chýbajú a jej platnosť nie je jednoznačná. Byť „lepšie chránený“ neznamená jednoducho vyššiu koncentráciu obranných látok. Slimáky *Balea perversa* a *Chondrina clienta* na vápencových stenách preferujú tie druhy lišajníkov, ktoré umožňujú juvenilom najväčšie prírastky (*Aspicila calcarea*, *Caloplaca flavovirescens*, v tomto poradí). *C. flavovirescens* je na rozdiel od *A. calcarea* bohatá na sekundárne látky (Baur et al. 1994). Z toho by sme mohli predpokladať, že nie všetky sekundárne metabolity lišajníky chránia a že rôzne druhy lichenofágov majú rôzne schopnosti tieto látky spracovať, inými slovami, že odpudivé účinky lišajníkových látok nie sú univerzálne. Táto potravná diferenciácia zároveň môže byť mechanizmom umožňujúcim koexistenciu týchto dvoch druhov slimákov (Baur et al. 1994).

Rozdiel v účinnosti obrany tých istých lišajníkov ilustruje aj pokus s dvomi druhmi roztočov (Reutiman & Scheidegger 1987). Kým *Fuscozetes setosus* preferoval *Cladonia symphycarpha* so zníženým obsahom sekundárnych metabolitov (atranorin a kyselina norstiktová), *Carabodes intermedius* dal naopak prednosť stielkam s ich normálnym obsahom. V tom istom

pokuse sa výrazne zvýšila konzumácia obomi roztočmi pľuzgierky *Cetraria islandica* ak z nej boli sekundárne metabolity (kyseliny protolichesterinová a fumarprotocetrarová) vymyté. Z pokusu vyplývajú dva dôležité poznatky: metabolity môžu pôsobiť aj ako atraktant a preferencie závisia aj na samotnej štruktúre stielky. Roztoče totiž medzi *C. symphicarpia* a *C. islandica* v akejkolvek kombinácii (metabolity + vs +, - vs -, + vs -, - vs +), vždy uprednostnili *Cladonia* (Reutiman & Scheidegger 1987), ktorej stielka nie je tak tvrdá ako stielka *Cetraria*.

Porovnania viacerých druhov jedného rodu tiež prinášajú zmiešané výsledky. Zo štyroch druhov *Peltigera* mäkkýše zjavne uprednostňujú *P. praetextata* a *P. degenii*, ktoré sekundárne metabolity neobsahujú, oproti *P. horizontalis* a *P. neckeri*, a to tak v laboratórnych ako aj prirodzených podmienkach (Benesperi & Tretiach 2004). Na druhej strane zo štyroch druhov rodu *Lobaria* sú mäkkýšmi najviac preferované *L. virens* (s najmenším obsahom sekundárnych metabolitov) a *L. pulmonaria* (s najvyššou koncentráciou látok) (Asplund et al. 2010). Napriek tomu sekundárne metabolity *L. pulmonaria* preukázateľne poskytujú ochranu pred herbivormi (Asplund & Gauslaa 2008).

1.2.6 Preferencie v rámci stielky

Ani v rámci jednej stielky nie je spásanie rovnomerné. *Arion fuscus* preferuje cefalódiu tripartitného lišajníku *Nephroma arcticum*, ktoré neobsahujú žiadne obranné látky. Po vymytí metabolitov medzi cefalódiami a ostatnými časťami stielky nerozlišuje (Asplund & Gauslaa 2010). Čiha lesklá *Cochlodina laminata* (cz: vřetenovka hladká) sa vyhýba medule *Lobaria scrobiculata* a *L. pulmonaria*. Po odstránení sekundárnych metabolitov však konzumuje všetky vrstvy (Asplund 2011). Rozlišovanie vrstiev sa líši aj medzi jednotlivými druhmi slimákov. Napr. *Helicigona lapicida* odstráni celú stielku *X. parietina* alebo *Physcia adscendens*, zatiaľ čo *Chondrina clienta*, *Balea perversa* a *Clausilia bidentata* zanechávajú „jamky“ rôznej hĺbky (Baur et al. 2000).

Teória optimálnej obrany (McKey 1974) predpokladá, že cennejšie časti stielky, t. j. reprodukčné, by mali byť pred herbivormi lepšie chránené, pretože ich poškodenie znižuje fitness výraznejšie než poškodenie somatických častí. Ukazuje sa, že u lišajníkov by táto teória mohla skutočne platiť. V apotéciách *X. parietina* a v soredióznych lalokoch *Vulpicida pinastri* a *H. physodes* boli namerané vyššie koncentrácie sekundárnych metabolitov než vo zvyšku stielky (Hyvärinen et al. 2000). Taktiež u *Pseudocyphellaria crocata* kyselina pulvinová obsiahnutá v soráloch (na rozdiel od zvyšku stielky) spôsobuje, že sa im mäkkýše vyhýbajú. Tým sa môžu výrazne zvýšiť šance na prežitie sorédií oddelených od materskej stielky (Gauslaa 2008). *Lobaria scrobiculata* obsahuje päťkrát vyššie koncentrácie meta-skrobikulínu v soráloch než v somatických častiach stielky a *Cochlodina laminata* sa im vyhýba. Naopak po odstránení metabolitov ich vyhľadáva (Asplund et al. 2010a). To je jednoznačný a silný dôkaz na podporu teórie optimálnej obrany.

U mnohých ďalších lišajníkov to však neplatí a v tejto problematike by sa dala vidieť aj opačná logika – pre lišajník by mohlo byť výhodné chrániť si apotécia menej v prípade, že lichenofág roznáša jeho spóry. To by mohol byť prípad *Tephromela atra*, u ktorej nebol

zistený rozdiel v koncentrácii sekundárnych metabolitov medzi reprodukčnými a nereprodukčnými časťami stielky (Hesbacher et al. 1996).

1.2.7 Ekologické dôsledky

Bez ohľadu na to, či sú príčinou sekundárne metabolity alebo nie, lichenofágovia zjavne vyhľadávajú niektoré druhy viac, než iné. Recentné práce naznačujú, že nerovnomernosť predáčného tlaku môže významne ovplyvňovať jednotlivé druhy lišajníkov, fitness jednotlivých stielok, ich populácie aj štruktúru lišajníkových spoločenstiev. Vplyv herbivorov na spoločenstvá rastlín je populárnou a dobre preskúmanou témou. V prípade lišajníkov sú informácie strohé, práce zaoberajúce sa touto problematikou sa objavujú až v poslednej dobe.

Z hľadiska ekologických dôsledkov aktivity spásačov je najlepšie preštudovaný ohrozený epifytický lišajník *Lobaria pulmonaria*. V prvom rade, lichenofágia znižuje reprodukčný úspech druhu. Asplund & Gauslaa (2008) experimentálne dokázali, že zabránením prístupu mäkkýšov k mladým stielkám sa výrazne zvýši ich šanca na prežitie. Scheidegger (1995) tiež predpokladal, že časť transplantovaných vegetatívnych diaspór *L. pulmonaria* sa stratila v dôsledku aktivity živočíchov (mäkkýše aj článkonožce).

Ďalšie práce poskytujú dôkazy, že predáčny tlak na *L. pulmonaria* môže viesť k rozmiestneniu stielok hlavne v mikrohabitatoch, ktorým sa mäkkýše z rôznych dôvodov vyhýbajú a spôsobovať tak posuny ekologickej niky. Podľa Vatne et al. (2010) je výskyt *L. pulmonaria* „trade-off“ medzi netoleranciou lišajníku k nízkemu pH substrátu a vysokým rizikom spásania na substráte s vyšším pH. Početnosť mäkkýšov na kyslejšom substráte je totiž nižšia. Autori sa domnievajú, že práve spásanie mäkkýšmi môže byť faktorom limitujúcim výskyt *L. pulmonaria* v listnatých lesoch na zásaditých vápencových pôdach. Taktiež z už spomínanej práce Asplund & Gauslaa (2008) okrem iného vyplýva aj to, že mäkkýše spôsobujú *L. pulmonaria* (mladým aj zrelým a veľkým stielkam) väčšie škody tam, kde koruny stromov poskytujú viac tieňa. Môže tak dochádzať k zmenšeniu realizovanej ekologickej niky tohto pralesného druhu.

Štúdia, ktorá porovnávala štyri druhy rodu *Lobaria* (Asplund et al. 2010) ukázala, že ich prirodzená distribúcia silne súvisí s preferenciami ulitníkov. Najviac preferovaná *L. scrobiculata* sa prevažne vyskytuje na lokalitách s nízkou početnosťou mäkkýšov (boreálne lesy alebo stromy s nižším pH kôry). Druhá najpreferovanejšia *L. amplissima* síce rastie na lokalitách s početnými populáciami mäkkýšov, ale vyššie na kmeni. Predáčny tlak je totiž podľa autorov najintenzívnejší pri zemi a s výškou na kmeni klesá. Najmenej preferované *L. pulmonaria* a *L. virens* bežne rastú v najspodnejších častiach kmeňa. Z práce tiež vyplýva, že preferencie medzi týmito štyrmi druhmi nesúvisia s obsahom sekundárnych metabolitov.

Posun ekologickej niky v dôsledku tlaku zo strany mäkkýšov je zdokumentovaný aj u ďalšieho pralesného taxónu *Pseudocyphellaria crocata*. Gauslaa (2008) predpokladá, že v dôsledku klimatických zmien sa v SZ Nórsku zvyšuje aktivita mäkkýšov. Tým vysvetľuje pozorované miznutie *P. crocata* zo skál a báz listnatých stromov a ich častejší výskyt na vetvičkách smreku.

Asplund & Gauslaa (2010) sa tiež domnievajú, že už spomínané selektívne spásanie slizovca hnedého (*A. fuscus*, cz: plzák hnědý) cefalodii *N. arcticum* môže viesť až k nedostatku dusíku a spomaleniu rastu v oblastiach s bohatými populáciami *A. fuscus*. Tak by mohla byť tvorená južná hranica rozšírenia tohto arkticko-boreálneho lišajníku (Asplund & Gauslaa 2010).

Zaujímavý prípad kontroly abundancie a diverzity lišajníkov slimákmi publikovali Fröberg et al. (2011). Sledovali horizontálne povrchy vápencových skál na Great Alvar v Švédsku, ktorý porastajú lišajníky a sinice. V hornine sú praskliny, ktoré poskytujú útočisko slimákovi chondrina skalná (*Chondrina clienta*, ovsenka žebernatá). Táto práca dobre ilustruje zložitosť celého problému, odpovede rôznych skupín lišajníkov na predачný tlak sa totiž líšia. Pri vyššej hustote populácie *C. clienta* abundancia aj diverzita endolitických lišajníkov stúpa, naopak abundancia epilitických lišajníkov klesá. Podľa autorov, by sa teda dalo predpokladať, že odstránením epilitických lišajníkov a siníc dochádza ku kompetičnému uvoľneniu (svetlo), čo zvýhodňuje endolitické lišajníky.

Z celkom iného prostredia pochádza práca Shachak et al. (1987), ktorí v izraelskej púšti Negev pozorovali spásanie endolitických lišajníkov ulitníkmi *Euchondrus albulus* a *E. desertorum*. Vypočítali, že zvetrávanie hornín v púšti činnosťou slimákov prispieva k pôdotvorbe približne rovnakou intenzitou ako zvetrávanie činnosťou vetra. Táto práca dokazuje aký nezanedbateľný význam môžu mať interakcie medzi slimákmi a lišajníkmi. Zároveň naznačuje, že ich najvýznamnejší dopad, možno práve v podobných ekosystémoch, ešte len čaká na svoje odhalenie.

1.3 Ciele práce

Dostupné práce zaoberajúce sa interakciami medzi mäkkýšmi a lišajníkmi sa sústreďujú na obmedzené množstvo druhov alebo len na určité ekologické či geografické podmienky. Moja diplomová práca by mala byť príspevkom k tejto problematike. Zaoberala som sa v nej efektom sekundárnych metabolitov na lichenofágne mäkkýše a preferenciami spásačov epifytických lišajníkov v ich prirodzenom prostredí.

Ako ciele práce som si stanovila:

1. zistiť, či sekundárne metabolity ochraňujú vybrané druhy lišajníkov voči mäkkýšom a či sa táto ochrana mení v závislosti na druhu lišajníku a druhu slimáka
2. overiť aké látky vybrané lišajníky obsahujú
3. zistiť aký intenzívny je predачný tlak na epifytické lišajníky v prirodzenom prostredí
4. zistiť, či sú jednotlivé druhy lišajníkov voči iným spásачmi v prirodzených podmienkach preferované

Metodické prístupy zvolené k dosiahnutiu stanovených cieľov spočívali v založení série laboratórnych pokusov, v tenkovrstvej chromatografii (TLC) a transplantáčnom pokuse.

1.4 Vybrané organizmy

Na pokusy som si vybrala osem druhov epifytických lišajníkov (obr. 2) a dva druhy slimákov (obr. 1).

Parmelia sulcata Taylor (1836) – diskovka ryhovaná; kortikolný druh, prevažne na kôre listnatých stromov, ale aj saxikolne; tolerantá k prostrediu bohatému na dusík avšak náchylná na znečistenie SO₂; kozmopolitný druh (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

- sekundárne metabolity: atranorin, kyseliny salazinová (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011) a konsalazinová (Thell & Moberg 2011)

Parmelia saxatilis (L.) Ach. (1803) – diskovka skalná; kortikolný aj saxikolný druh, často na substráte s nižším pH, menej citlivá na SO₂, ale vyhýba sa eutrofizovaným stanovištiám; kozmopolitný druh (Smith et al. 2009).

- sekundárne metabolity: atranorin, kyseliny salazinová, lobarová (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011, Wirth 1995), norstiktová (Smith et al. 2009, Wirth 1995), lichesterinová (Wirth 1995), protocetrarová a konsalazinová a chloratranorin (Thell & Moberg 2011)

Parmelina tiliacea (Hoffm.) Hale (1974) – diskovka lipová; kortikolný druh, prevažne na obohatenej kôre, často na otvorených stanovištiach, v parkoch a stromových alejách, príležitostne aj na skalách; rozšírená v Európe, Afrike, Ázii a Makaronézii (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

- sekundárne metabolity: atranorin, kyselina lekanorová (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011)

Melanelixia glabratula (Lamy) Sandler-Berlin (2011) – diskovka sivohnedá; kortikolný aj lignikolný druh, prevažne na listnatých stromoch, vzácné saxikolný; výskyt: Európa, Afrika, Ázia, Makaronézia, Severná a Stredná Amerika (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

- sekundárne metabolity: kyselina lekanorová (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011), kyselina 5-metoxylekanorová, skyrin a neznáme látky (Smith et al. 2009).

Melanelixia subaurifera (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch (2004) – diskovka; kortikolný druh, prevažne na listnatých stromoch, vzácné aj na ihličnanoch, na dreve alebo skalách, jemne tolerantný k znečisteniu; rozšírenie: Európa (vrátane Islandu), Afrika, Ázia, Makaronézia, Severná a Stredná Amerika (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

- sekundárne metabolity: kyselina lekanorová a subauriferin (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

Melanelixia glabra (Schaer.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch (2004) – diskovka; kortikolný horský a podhorský druh, citlivý na eutrofizáciu (Thell & Moberg 2011, Wirth 1995)

- sekundárne metabolity: kyselina lekanorová (Thell & Moberg 2011, Wirth 1995).

Melanohalea exasperata (De Not.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch (2004) – diskovka; epifytický druh, prevažne na vetvičkách listnatých stromov, na kmeňoch len občas, na iných substrátoch (ihličnany, drevo, ploty, skaly) vzácné, pravdepodobne citlivá na znečistenie; rozšírenie: Európa, Afrika, Makaronézia, Ázia, Severná Amerika (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

- neobsahuje žiadne látky detekovateľné TLC.

Melanohalea exasperatula (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch (2004) – diskovka; epifytický na vetvičkách hlavne listnatých stromov, v najsevernejších častiach svojho areálu aj na ihličnanoch a saxikolne, tolerantná k eutrofizácii aj k znečisteniu SO₂; rozšírenie: Európa, Afrika, Makaronézia, Ázia, Severná Amerika (Smith et al. 2009, Thell & Moberg 2011).

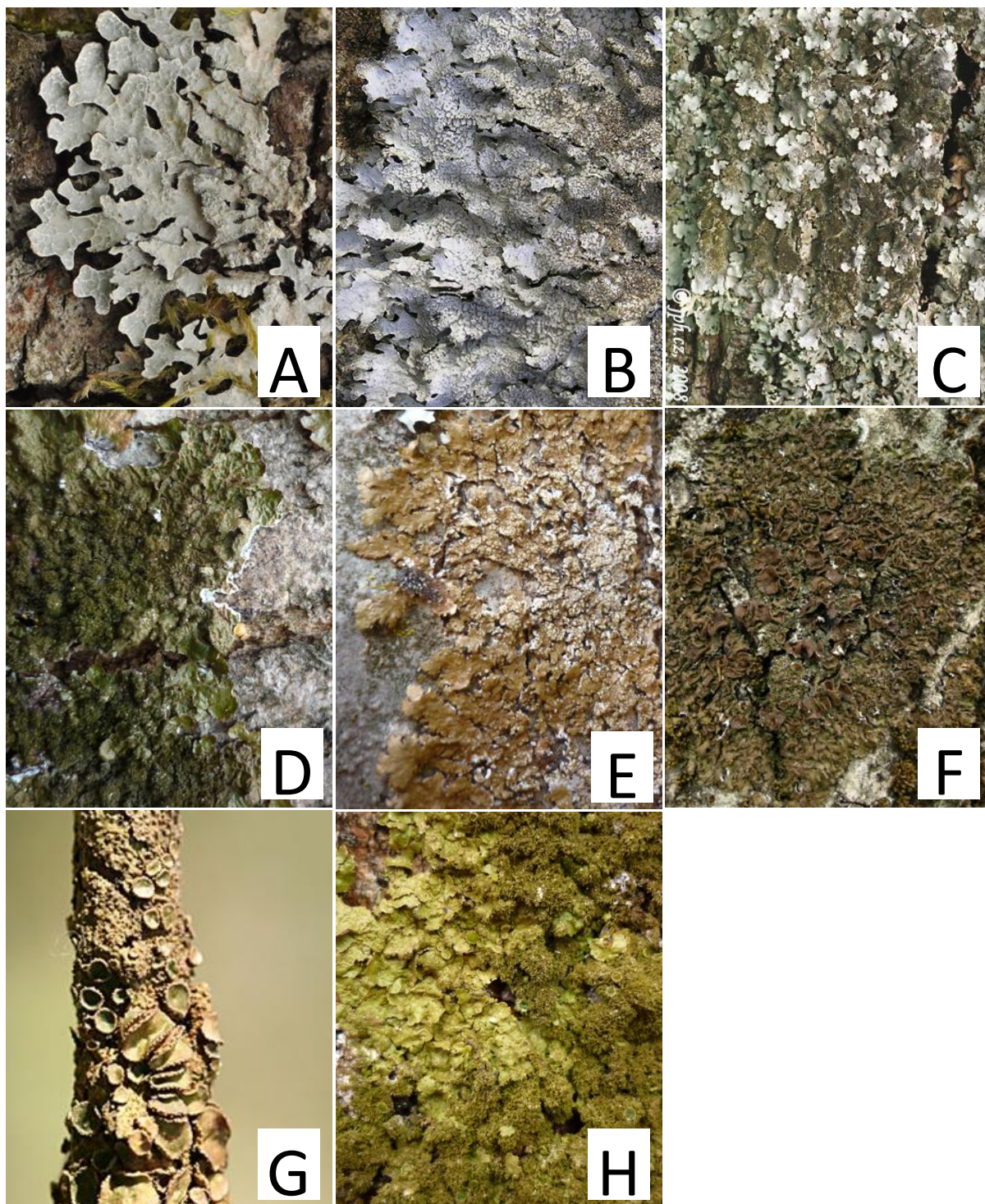
- neobsahuje žiadne látky detekovateľné TLC.

Lehmania marginata Müller (1774) – slizniak stromový (cz: podkornatka žíhaná), obýva listnaté a zmiešané lesy v horách a pahorkatinách, za vlhkého počasia šplhá vysoko do korún, často sa zdržuje v trhlinách kôry a v dutinách, tiež na skalách; európsky druh okrem južného Balkánu a najsevernejších častí Škandinávie (Pfleger 1988, Ložek 1956).

Cochlodina cerata Rossmässler (1836) – ciha (cz: vřetenka vosková), obýva lesy hlavne na vápencovom podklade, od xerothermných až po vysokohorské (Kerney et al. 1983), zdržiava sa pri skalách a kmeňoch a v sutiach (Ložek 1956), za vlhkého počasia šplhá do určitej výšky na kmene stromov (L. Juříčková, pers. comm.); karpatský druh (Ložek 1956).



Obr 1 Slimáky použité v pokusoch: A, B - *Cochlodina cerata*; C, D - *Lehmania marginata*



Obr 2 Lišajníky použité v pokusoch: A - *Parmelia sulcata* (foto J. Malíček); B - *Parmelia saxatilis* (foto J. Malíček); C - *Parmelina tiliacea* (foto J. Halda); D - *Melanelixia glabratula*; E - *Melanelixia subaurifera*; F - *Melanelixia glabra*; G - *Melanohalea exasperata* (foto F. Bouda); H - *Melanohalea exasperatula*

1.5 Použité skratky

Skratky lišajníkov:

SULC – *Parmelia sulcata*

SAX – *Parmelia saxatilis*

TILI – *Parmelina tiliacea*

FUL – *Melanelixia glabratula* (skratka pochádza zo staršieho názvu *M. fuliginosa*)

SUBAU – *Melanelixia subaurifera*

GLAB – *Melanelixia glabra*

ETA – *Melanohalea exasperata*

ELA – *Melanohalea exasperatula*

MEL – rod *Melanohalea*, teda *M. exasperata* a *M. exasperatula* spolu

Skratky slimákov:

LM – *Lehmannia marginata*

CC – *Cochlodina cerata*

Ďalšie skratky:

pl – plocha

vh – váha

Napr. skratka LM_SULC_vh teda odkazuje na výsledok pokusu s *L. marginata* a *P. sulcata* počítaný na základe váhy, CC_ETA_pl na výsledok pokusu s *C. cerata* a *M. exasperata* počítaný na základe plochy.

2. MATERIÁL A METÓDY

2.1 Materiál

Všetok použitý materiál (lišajníky aj slimáky) pochádzal z Muránskej planiny, z niekoľkých tých istých lokalít. *Cochlodina cerata* bola nazbieraná za vlhkého počasia z kôry stromov alebo z lesného opadu nad obcou Muránska Zdychava (N48,74558° E20,12539°) a na Šianciach (N48,77739° E20,10095°) (všetky uvádzané koordináty GPS sú podľa systému WGS 84). Zbierané boli len dospelé jedince (71 ks) s vyvinutým obústím. V priemere vážili $0,126 \pm 0,008$ g. *Lehmannia marginata* bola za dažďa pozbieraná z kmeňov stromov taktiež na Šianciach. Veľkosť jedincov (64 ks) bola značne variabilná – $0,49 \pm 0,256$ g, avšak podľa Hanleyho et al. (2003) nie je konzumácia závislá na hmotnosti jedinca. Slimáky boli po nachytaní chované pri izbovej teplote, v nádobe bola udržiavaná vlhkosť a každý druhý deň bola čistená. Po ukončení pokusov som slimáky vrátila na miesto zberu. Tabuľka 2 zobrazuje lokality zberu lišajníkov.

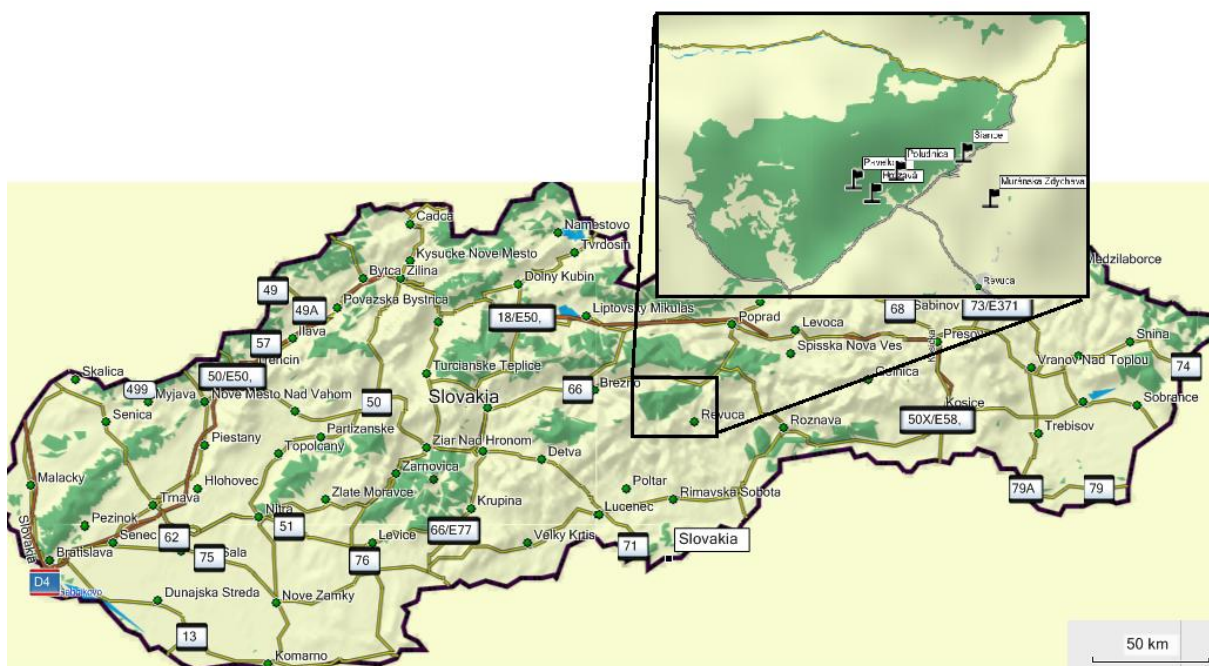
	pokusy s CC	pokusy s LM	transplant. pokus
<i>P. sulcata</i>	Muránska Zdychava	Muránska Zdychava	Poludnica, Šiance
<i>P. saxatilis</i>	Šiance	Šiance, Paveleková	–
<i>P. tiliacea</i>	Šiance	Šiance, M. Zdychava, Hrdzavá	–
<i>M. glabratula</i>	Muránska Zdychava	Šiance	Poludnica, Šiance
<i>M. subaurifera</i>	Muránska Zdychava	Paveleková	–
<i>M. glabra</i>	Muránska Zdychava	M. Zdychava, Hrdzavá	–
<i>M. exasperata</i>	Muránska Zdychava	Muránska Zdychava	Muránska Zdychava
<i>M. exasperatula</i>	Muránska Zdychava	Muránska Zdychava	Muránska Zdychava

Tab 2 Lokality zberu lišajníkov.

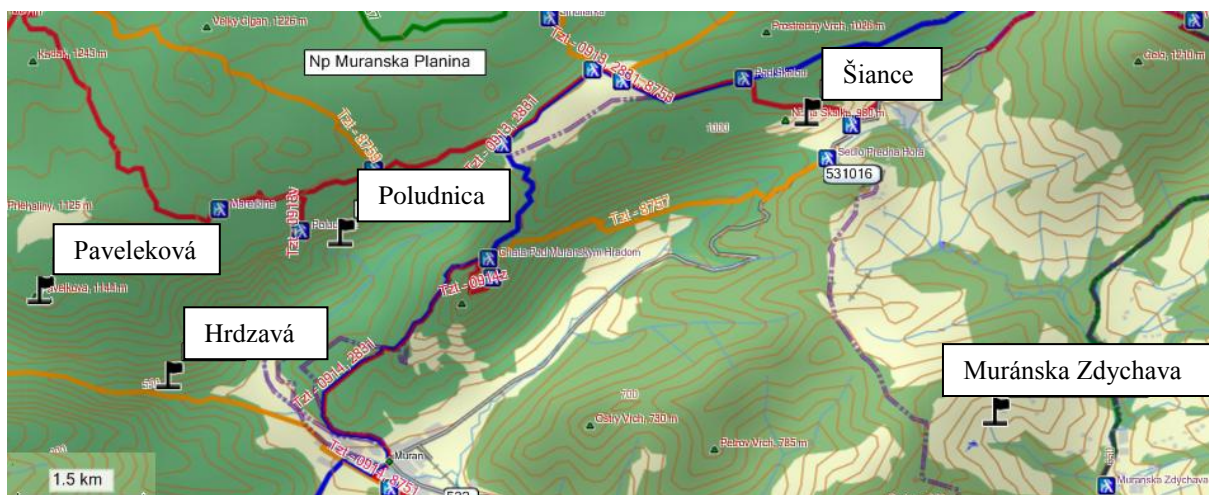
Lišajníky zbierané na Muránskej Zdychave pochádzali z ovocných stromov, na ostatných lokalitách – Šiance, Poludnica (N48,76461° E20,04052°), Hrdzavá (N48,74944° E20,01821°), Paveleková (N48,75861° E20,00156°) – boli zbierané z kôry buku, jaseňa a javora horského. Takisto lišajníky použité na kŕmenie slimákov pred pokusmi pochádzali z Muránskej Zdychavy. Mapy na obr. 3 a 4 ukazujú všetky lokality.

Lišajníky použité na pokusy s CC boli nazbierané maximálne mesiac pred pokusmi, s výnimkou SUBAU, ktorá bola zbieraná 2-3 mesiace pred. Lišajníky na pokusy s LM boli zbierané max. 6 týždňov pred zahájením pokusov, opäť s jednou výnimkou – GLAB bola nazbieraná až 7 mesiacov dopredu. ETA a ELA na transplantačný pokus boli nazbierané dva mesiace, časť FULIG mesiac a zvyšné stielky FULIG spolu so všetkými SULC len pár dní pred jeho založením.

Ak neboli lišajníky použité do týždňa po zbere, boli vysušené a skladované v mraziaku. Zamrazenie lišajníkov v suchom stave neznižuje ich životaschopnosť – po rehydratácii sa ich fyziologické funkcie obnovia, je preto vhodným spôsobom dlhodobiejšieho skladovania (Honegger 2003).



Obr 3 Umiestnenie Muránskej planiny na mape SR s vyznačenými lokalitami zberu. Mapa bola vytvorená v programe MapSource 6.15.7 (Garmin Ltd. or its subsidiaries 1999-2009).



Obr 4 Detailnejšia mapa, čierne vlajky označujú lokality zberu. Mapa bola vytvorená v programe MapSource 6.15.7 (Garmin Ltd. or its subsidiaries 1999-2009).

2.2 TLC

Všetkých osem druhov lišajníkov vybraných na túto prácu nie je problém určiť morfológicky a preto sa na nich chromatografia bežne nerobí. Sú to v podstate bežné druhy a je viac menej známe aké látky obsahujú. Pre niektoré druhy však rôzne zdroje uvádzajú rôzne sekundárne metabolity, hlavne čo sa týka minoritných látok. U lišajníkov je však bežné, že sa v ich chemizme vyskytujú odchýlky a ani viacero chemotypov jedného druhu nie je ničím vzácnym. Práve preto som pred začatím pokusov chcela pomocou tenkovrstvej chromatografie overiť či použité lišajníky obsahujú látky zhodné s literatúrou.

TLC som robila podľa štandardnej metodiky (Orange et al. 2010, Culberson 1972) na sklenených TLC doskách (SIL-25, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG). Ako štandard som použila atranorin a kyselinu norstiktovú z *Cladonia symphicarpia*. Vzorky (10 z každého druhu) pochádzali z tých istých stielok, ktoré boli použité na pokusy.

2.3 Laboratórne pokusy

Pokus bol zostavený podľa dizajnu Gauslaa (2005) a spočíval v tom, že dvojica spásačov jedného druhu dostala na výber medzi dvomi časťami jednej stielky lišajníku, jednou bez sekundárnych metabolitov a druhou v prirodzenom stave. Cieľom pokusu bolo zistiť, či sekundárne metabolity vybraných lišajníkov majú ochrannú funkciu pred ich prirodzenými predátormi.

Konkrétne som si v tomto pokuse kládla nasledovné otázky:

1. Je vymytá polovica stielky (= bez/so zníženým obsahom metabolitov) oproti kontrolnej preferovaná? (t. j. Ochránujú sekundárne metabolity lišajníky pred týmito slimákmi?)
2. Líši sa miera ochrany medzi jednotlivými druhmi lišajníkov?
3. Líši sa efekt ochrany daného druhu lišajníku na jednotlivé druhy slimákov?

2.3.1 Príprava lišajníkov

Stielky boli pomocou skalpelu opatrne oddelené od kôry, očistené a potom sušené 24 h pri izbovej teplote. Následne som každú stielku rozdelila na dve približne rovnako veľké časti. Z jednej z nich boli odstránené lišajníkové látky a to tak, že som ju štyri krát na 20 minút ponorila do acetónu (PENTA, Ing. Petr Švec). Ako som už vysvetlila v úvode, v prípade vysušenej stielky acetón neznižuje životaschopnosť lišajníku (Solhaug & Gauslaa 2001). Stielky som opäť nechala schnúť 24 h pri izbovej teplote, aby sa všetok acetón dokonale vyparil a zvážila som ich na laboratórnych váhach (KERN ABJ, KERN & Sohn GmbH).

Tesne pred pokusom boli na niekoľko sekúnd ponorené do vody, aby sa stielka rehydratovala, potom som utrela povrchovú vodu. Obe časti jednej stielky (obr. 5) som položila na sklenú Petriho misku s priemerom 9 cm a vyfotila ich (Canon EOS 500D s objektívom Canon Macro lens EF-S 60mm 1:2,8 USM) tak, že som ich sploštila druhou časťou Petriho misky. Ako podklad som použila milimetrový papier, čo mi po ukončení pokusu umožnilo vypočítať plochu lišajníku.



Obr 5 *P. suclata* - príklad pokusnej misky. Na ľavej strane časť, z ktorej boli sekundárne metabolity extrahované (V), napravo normálna časť (N).

2.3.2 Príprava slimákov

Rozdiely v individuálnej konzumácii mäkkýšov môžu byť spôsobené geneticky podmienenými fyziologickými rozdielmi, odlišnými schopnosťami učiť sa, odlišnou recentnou konzumáciou a skúsenosťami a rôznou mierou hladu (Speiser 2001). S cieľom znížiť túto individuálnu variabilitu boli po nachytaní všetky slimáky kŕmené rovnakou stravou (*M. exasperatula*) a posledných 24 hodín pred pokusom už nemali prístup k žiadnej potrave (napr. Hanley et al. 2003).

2.3.3 Dizajn pokusu

Na každú Petriho misku s dvomi časťami jednej stielky lišajníku som umiestnila dva náhodne vybrané jedince cihy (CC). Slizniaky (LM) som kvôli enormnej variabilite vo veľkosti rozdelila podľa veľkosti na dve skupiny a do misiek náhodne pridelovala jedného z každej. Misky som zakryla sklenenou nádobou o objeme 720 ml (obr. 6). Pokus s cihou trval 72 hodín, so slizniakom 48 hodín. Doba trvania bola stanovená podľa predbežných vstupných pokusov, v ktorých jednotlivé druhy úplne skonzumovali najchutnejšiu stielku najčastejšie práve za takýto čas. Je to kompromis medzi výhodou a obmedzením dlhšieho trvania pokusu – znížila by sa variabilita medzi jednotlivými opakovaniami (Hanley et al. 2003), na druhej strane dlhší pokus by mohol poskytnúť skreslené výsledky, pretože u chutnejších druhov lišajníkov by boli stielky skonzumované v prvých dňoch a ďalšie dni by už slimáky nemali čo konzumovať. Pokus prebiehal pri izbovej teplote a prirodzenom svetelnom režime, komôrky neboli vystavené priamemu slnku. Počas pokusu boli pravidelne dvakrát denne zavlažované rozprašovačom, aby sa udržala dostatočná vlhkosť na aktivitu slimákov.

Spolu bolo teda založených 16 pokusov (kombinácie 2 slimákov a 8 lišajníkov), v každom 10 opakovaní. Pokusy s cihou (CC) prebiehali na prelome mája a júna 2011, so slizniakom (LM) v tom istom čase v roku 2012.



Obr 6 Pokusné komôrky.

2.3.4 Ukončenie pokusu

Po uplynutí stanovenej doby boli slimáky z komôrok vybraté a lišajníky boli očistené od exkrementov. Následne boli vyfotografované rovnakým spôsobom ako pred tým. Opäť som ich nechala schnúť 24 h pri izbových podmienkach a zvažila.

2.3.5 Vyhodnotenie

Pre každú polovicu stielky lišajníku som vypočítala absolútny aj percentuálny úbytok hmotnosti (strata biomasy v dôsledku konzumácie). Z fotografií som vypočítala plochu v programe ImageJ (Rasband 1997-2012) a následne tiež vypočítala jej absolútny aj percentuálny úbytok. V ďalších výpočtoch som pracovala s výsledkami na základe váhy aj na základe plochy. Oba spôsoby majú totiž svoje výhody. Za predpokladu, že bol lišajník pred pokusom dokonale vyčistený, by váha mohla poskytovať presnejšie výsledky. Zabudnuté malé kamienky alebo kúsky hliny a kôry mohli výsledné percento značne skresľovať. Nevýhodou počítania plochy je, že laloky rastú do priestoru a tak sa pri ich sploštení stane, že sa prekrývajú a výpočet plochy je nepresný. Na druhej strane, u niektorých druhov lišajníkov bolo pozorované spásanie výlučne vrchných vrstiev stielky (tj. len vrchná kôra + fotobiont alebo vrchná kôra + fotobiont + medula) a spodný kortex ostával nedotknutý (obr. 7). Keďže podľa mojich pozorovaní je to najhustejšia a teda aj najťažšia časť, takéto spásanie neurobí veľký rozdiel vo váhe. Avšak časti stielky pozostávajúce len zo spodnej kôry je rozumné považovať skôr za zožraté než nedotknuté a to umožňuje práve vyhodnocovanie na základe plochy.

Následne ma zaujímalo, či je vymytá polovica voči nevymytej preferovaná.



Obr 7 Ukážka výsledku pokusu s *C. cerata*. Z vymytej časti (V) *P. tiliacea* z veľkej časti zostal len tmavý spodný kortex. Miestami vidieť pozostatky vyšších vrstiev.

Aby som mohla porovnať účinky látok rôznych lišajníkov na daný druh slimáka, vytvorila som index miery ochrany, ktorý som vypočítala ako pomer plochy (váhy) skonsumovanej na vymytej polovici k celkovej skonsumovanej ploche (váhe). Index môže nadobúdať hodnoty od 0 do 1. 1 znamená, že slimák konzumuje len vymytú polovicu, ochrana metabolitmi je teda „dokonalá“, 0 znamená, že metabolity naopak slimáka dokonale priťahujú, hodnoty okolo 0,5 znamenajú, že metabolity na výber herbivora nemajú žiadny vplyv, že výber medzi dvoma časťami stielky je náhodný. Tieto hodnoty sa taktiež dajú očakávať u lišajníkov bez metabolitov.

Nakoniec som porovnala, či sa index miery ochrany daného druhu lišajníku líši medzi CC a LM.

2.3.6 Štatistické spracovanie

Všetky štatistické analýzy boli počítané v programe R 2.14.0 (R Development Core Team 2011, voľne dostupný na <http://www.R-project.org/>) s použitím grafického rozhrania R Commander (balíček Rcmdr).

Pri vyhodnocovaní bolo pre chybu vo vážení odstránené jedno z opakovaní LM_SULC a CC_SUBAU. V týchto prípadoch som teda počítala len s deviatimi opakovaniami. Týka sa to však len váhy, výpočty plochy boli urobené na všetkých desiatich.

Normalitu dát som overovala pomocou Shapiro-Wilkovho testu, histogramu a q-q diagramov.

Či je vymytá polovica oproti nevymytej slimákmi preferovaná som u kombinácií LM_SAX_pl, LM_TILI_pl, LM_FUL_vh, LM_SUBAU_pl, LM_ETA_pl, LM_ETA_vh, LM_ELA_pl, CC_ELA_pl a CC_ETA_vh overovala párovým t-testom. U všetkých ostatných kombináciách bol narušený predpoklad normálneho rozdelenia dát a preto som použila neparametrický párový Wilcoxonov test. Alternatívna hypotéza (H_1) v prípade všetkých šiestich lišajníkov so sekundárnymi metabolitmi bola jednostranná, pretože očakávaný výsledok bol, že vymývaná polovica bude oproti kontrolnej preferovaná. V prípade ETA a ELA bola H_1 obojstranná.

Index miery ochrany voči LM počítaný na základe váhy splňal podmienky normálneho rozdelenia a zhodných rozptylov (overené Bartlettovým testom), preto som k jeho porovnaniu medzi lišajníkmi použila jednovýberovú ANOVU s post-hoc mnohonásobnými porovnaniami (Tukeyho test). Na testovanie indexov LM_pl a CC_vh aj CC_pl bolo potrebné použiť neparametrický Kruskal-Wallisov test s následnými mnohonásobnými porovnaniami (z balíčku pgirmess).

Na index miery ochrany som sa pozrela aj z opačnej strany: rozdiel v efekte ochrany jedného druhu lišajníku na slimáky som testovala pomocou dvojvýberového t-testu (SULC_pl, SULC_vh, SAX_pl, SAX_vh, SUBAU_vh, GLAB_vh, ETA_vh) alebo dvojvýberového Wilcoxonovho testu v prípade, že bola narušená podmienka normality dát (TILI_pl, FUL_pl, FUL_vh, SUBAU_pl, GLAB_pl, ETA_pl, ELA_pl, ELA_vh).

Hladina významnosti pre všetky testy bola stanovená na $\alpha = 0,05$.

2.4 Transplantačný pokus

Pokus bol zostavený podľa Asplunda et al. (2010) a spočíval v tom, že som mriežky s nalepenými lišajníkmi (kombinácia viacerých druhov) pripevnila na stromy v lese. Cieľom pokusu bolo sledovať intenzitu spásania a preferencie lichenofágov v prirodzenom prostredí.

Konkrétne som si kládla nasledovné otázky:

1. Je predačný tlak na lišajníky v podmienkach stredoeurópskych listnatých lesov intenzívny?
2. Záleží intenzita spásania na mikroklimatických podmienkach?
3. Majú v prirodzenom prostredí spásači medzi lišajníkmi preferencie? Aké?
4. Sú prípadné preferencie zhodné s tým, čo by sa dalo očakávať podľa výsledkov laboratórnych pokusov?

Z ôsmich druhov lišajníkov použitých v laboratórnych pokusoch som na transplantáciu vybrala *P. sulcata*, *M. glabratula* a oba druhy rodu *Melanohalea*. SULC a FUL predstavujú druhy s dokázanou chemickou obranou, ktorá bola silnejšia u FUL. Napriek tomu sa FUL javila byť „chutnejšou“ potravou než SULC, pravdepodobne kvôli jemnejšej štruktúre stielky. ETA a ELA sú druhy bez chemickej obrany, o ktorých som predpokladala, že budú v pokuse oproti SULC a FUL výrazne preferované. V predbežnom pokuse slimáky nerobili medzi týmito dvomi druhmi rozdiel, preto som ich v transplantačnom pokuse považovala za jednu kategóriu MEL.

2.4.1 Príprava pokusu

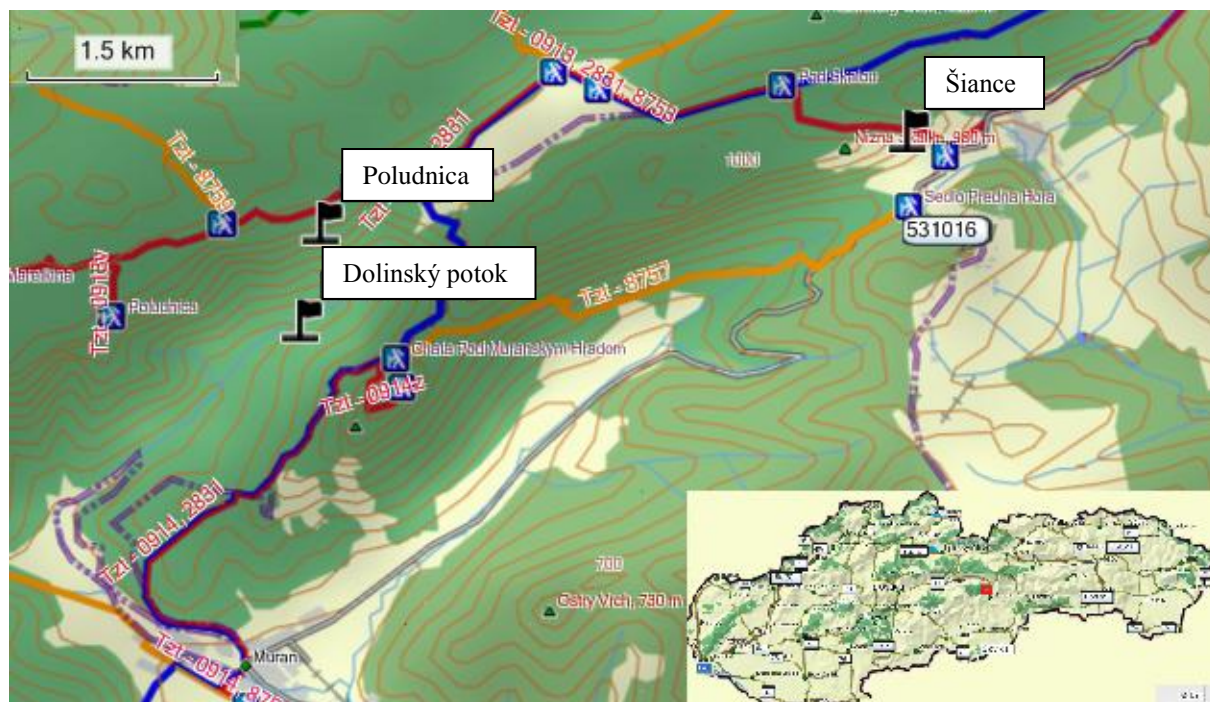
Všetky lišajníky boli očistené, veľké stielky rozdelené na menšie, neboli však oddelené od kôry, s ktorou boli zbierané. Vybrala som 60 SULC, 60 FUL, 30 ETA a 30 ELA. Stielky som vyfotila (Canon EOS 500D s objektívom Canon Macro lens EF-S 60mm 1:2,8 USM) na podklade milimetrového papiera, tentokrát však v suchom stave. Následne som náhodne skombinovala dve stielky SULC, dve FUL, jednu ETA a jednu ELA.

Tesne pred založením pokusu (8. - 10. 5. 2012) som si pripravila 30 obdĺžnikov (približne 15 × 14 cm) z mriežky z armovacej perlinky a epoxidovým lepidlom (3-ton Quick Epoxy Adhesive, Alteco Chemical Pte Ltd.) som na každú nalepila 6 stielok – 2 SULC, 2 FUL a 2 MEL. Ich rozmiestnenie bolo náhodné. Mriežky som zaťažila a lepidlo nechala cez noc uschnúť. Nakoniec som celé mriežky znovu vyfotila, tiež na milimetrovom papieri.

2.4.2 Lokality

Mriežky boli transplantované na tri lokality na území NP Muránska Planina, SV od obce Muráň (mapa na obr. 8). Všetky tri lokality pokrývajú bukové lesy na vápencovom podloží. V prípade Šiancí sa jedná o hrebeňovú časť strmého suťového svahu. Lokalita sa nachádza v NPR Šiance, s prirodzenou vegetáciou. K buku sa tu primiešava javor horský, lipa a jedľa. Z južnej strany v najstrmších častiach vznikajú svetlé porasty lipy, drieňa a hlohu. Za

hrebeňom sa zo severnej strany nachádza suchý hospodársky smrekový les. Lokalita Dolinský potok je takmer úplným záverom hlbokkej doliny Dolinského potoka, tadiaľto prechádza spodná hranica NPR Poludnica. K buku sa tu primiešava jedľa a javor horský. Transplantované mriežky boli upevňované po oboch stranách potoka, avšak nikdy nie ďalej než 10 m. Lokalita nazvaná Poludnica leží na viac-menej rovnej ploche nad hranicou rezervácie, nad strmými svahmi a bralami NPR. Jedná sa o rovnoveký bukový porast miestami preriedený ťažbou.



Obr 8 Lokality transplantačného pokusu. Na mape SR v pravom dolnom rohu je vyznačená zobrazená oblasť. Mapa bola vytvorená v programe MapSource 6.15.7 (Garmin Ltd. or its subsidiaries 1999-2009).

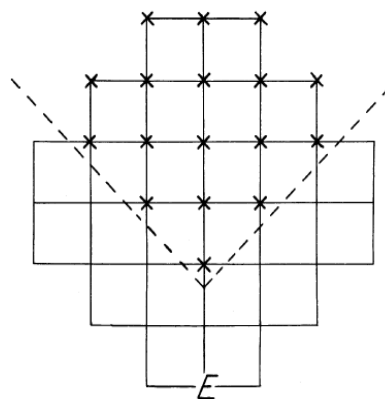
2.4.3 Založenie pokusu a meranie charakteristík prostredia

Pokusy boli založené 12. -14. 5. 2012. Na každej lokalite bolo v programe fGIS (Brown 2003-2005, voľne dostupný na <http://www.forestpal.com/fgis.html>) náhodne vybraných 10 GPS bodov. Následne v teréne bol pomocou GPS navigácie (Oregon 450, Garmin) vybraný buk najbližší k určenému bodu. Buk sa javil byť vhodným na pokus jednak preto, že je na lokalitách najbežnejšou drevinou a aj preto, že počas plánovania pokusu som za vlhkého počasia bežne videla mäkkýše šplhať po ich kmeňoch. Mriežky (obr. 9) boli pripevňované zo SZ strany do výšky 110 cm od zeme (stred mriežky). Výšku od zeme som merala na SZ strane, z iných strán sa mohla líšiť, keďže stromy boli väčšinou v svahu. Mriežky som pripevňovala ručnou sponkovačkou na obklad (Novus, sponky 23/8). Pripevnené mriežky boli opäť vyfotené (Olympus E-510, objektív Olympus Zuiko Digital 14-22 mm 1:3,5-5,6). Pri každom strome som si zaznamenala jeho priemer vo výške 110 cm a obvod báze. Približne v polovici trvania pokusu som všetky lokality opäť navštívila a všetky mriežky vyfotila.



Obr 9 Mriežka v transplantačnom pokuse.

V polovici augusta som pomocou konvexného sférického denziometra (R. E. Lemmon, Forest Densiometers, Rapid City, USA) odhadovala korunový zápoj. Sférický denziometer je zakrivená šošovka s vyznačenou sieťou 24 štvorcov. Na odhadovanie zápoja som použila metódu Lemmona (1957) upravenú podľa Stricklera (1959), ktorá spočíva v odčítavaní zápoja zo 17 bodov v klinovom výseku šošovky (obr. 10) smerom na každú svetovú stranu, pričom je denziometer vo fixnej pozícii a „odčítavajúci“ sa pohybuje okolo. Spolu sa teda korunový zápoj odhaduje zo 68 bodov ($= 17 \times 4$). Každému bodu som pridelila hodnotu 1,47 %, spolu je to teda 99,96 %, čo je trošku presnejšie než 102 %, ak sa bodom pridelí hodnota 1,5 % ako to počíta pôvodná metóda (Strickler 1959). Pri odčítavaní



zakrytých bodov som denziometer držala vo vzdialenosti asi 25 cm od tela vo výške lakťa.

Obr 10 Odčítavanie korunového zápoja zo 17 bodov v klinovom výseku. Prevzaté od Stricklera (1959).

2.4.4 Ukončenie pokusu

Mriežky som skladala zo stromov 3. - 4. 9. 2012, pokus teda trval 112-114 dní (Šiance 114, Poludnica 112, Dolinský potok 113). Pred zložením bola každá mriežka vyfotená. Po privezení do Prahy som mriežky opäť vyfotila rovnako ako pred pokusom.

2.4.5 Vyhodnotenie

Úbytok biomasy lišajníkov počas trvania pokusu bol stanovený na základe výpočtu plochy pred a po pokuse v programe ImageJ (Rasband 1997-2012). Pri počítaní plochy boli fotky z jednotlivých fáz pokusu starostlivo porovnávané.

Pre každú mriežku som vypočítala úbytok plochy jednotlivých druhov/skupín lišajníkov (FUL, SULC, MEL):

$A_{\Delta i} = A_{0i} - A_{1i}$ A_{0i} – počiatočná plocha druhu lišajníku i (súčet plôch dvoch stielok)

A_{1i} – plocha druhu lišajníku i po skončení pokusu (opäť súčet oboch stielok)

$A_{\Delta i}$ - plocha skonsumovaná z druhu lišajníku i

a celkové percento obžeru každého druhu/každej skupiny ($A_{\Delta i} / A_{0i}$).

Preferencie medzi druhmi v rámci mriežky som vyjadrila ako percento obžeru každého druhu v pomere k sume percent obžeru všetkých druhov na mriežke:

$P_i = \frac{A_{\Delta i} / A_{0i}}{\sum_{i=1}^n A_{\Delta i} / A_{0i}}$ P_i – preferenčný index pre druh lišajníku i

n – počet typov potravy, medzi ktorými je na výber (=3)

Výsledný index je vlastne zhodný so selekčným indexom podľa Krebsa (1999), ktorý je výhodný v prípade, že nie všetky typy potravy sú dostupné v rovnakom množstve. To je dôležité aj v mojom pokuse, keďže nie všetky stielky použité na vytvorenie jednej mriežky boli rovnako veľké. Práve preto nie je možné použiť jednoduchší a intuitívnejší výpočet indexu, ktorý by bol pomerom plochy obžeru na druhu i a celkovej plochy obžeru na mriežke ($A_{\Delta i} / \sum_{i=1}^n A_{\Delta i}$).

Preferenčný index teda nadobúda hodnoty od 0 do 1. Hodnota (1/počet typov potravy) indikuje nulovú preferenciu. To v prípade môjho transplantačného pokusu znamená, že ak by bol index pre každý druh v rámci mriežky rovný 1/3, spásanie by bolo náhodné. Hodnoty blížiac sa k 1 by znamenali, že spásači na mriežke vyhľadávali len daný druh, kým hodnoty blízke 0 by znamenali, že sa mu celkom vyhýbali.

2.4.6 Štatistické spracovanie

Všetky štatistické analýzy boli opäť počítané v programe R 2.14.0 (R Development Core Team 2011) s použitím R Commander (balíček Rcmdr). Na randomizácie bol použitý ten istý program.

Pred samotným vyhodnocovaním pokusu som overila, či je predpoklad o ETA a ELA správny, či ich teda môžem v tomto pokuse považovať za jednu kategóriu. Párovým testom som porovnala ich obžer v percentách ako aj mieru preferencie, teda preferenčný index.

Keďže oba súbory nie sú na sebe nezávislé a ani nemajú normálne rozdelenie, použila som neparametrický Wilcoxonov test.

Následne som sa pozrela na vlastnosti celkového obžeru. Keďže jednotlivé mriežky sa líšili plochou nalepených lišajníkov, v prvom rade ma zaujímalo, či existuje závislosť medzi celkovým obžerom a počiatočnou veľkosťou lišajníkov. V prípade, že by miera obžeru závisela na počiatočnej ploche, analýza a interpretácia výsledkov by sa skomplikovala. To som testovala pomocou lineárnej regresie.

Ďalej ma zaujímalo, či sa celkový obžer mriežok líšil medzi jednotlivými lokalitami a či bol ovplyvnený niektorou zo zaznamenávaných premenných. Najprv som si graficky premietla vzťah celkového obžeru a jednotlivých premenných (krabicové a bodové grafy) a pre lokalitu som vypočítala analýzu rozptylu s párovými porovnaniami.

Či sa tieto premenné prostredia líšia medzi lokalitami som zobrazila krabicovými diagramami a formálne testovala neparametrickým (u všetkých troch premenných bol narušený predpoklad normálneho rozdelenia) Kruskal-Wallisovým testom s párovými porovnaniami.

Potom som zostavila lineárny model, v ktorom som celkový obžer mriežky v percentách chcela vyjadriť ako funkciu korunového zápoja, priemeru kmeňa stromu, veľkosti báze stromu, lokality, interakcie priemeru a báze stromu a interakcií lokality so zvyšnými tromi premennými ($f_{see} = (\text{kor. zápoj} + \text{priemer} * \text{báza}) * \text{lokalita}$). Aby som získala čo najlepší model následne som postupne odstraňovala jeho jednotlivé komponenty („stepwise backwards regression“). V súlade s pravidlom marginality som začala s odstránením interakcií, ktorých efekt nebol v modeli signifikantný. Potom som postupne odstraňovala aj ďalšie zložky až kým som neprišla k modelu, ktorý sa javil byť najvhodnejší.

Následne ma zaujímal vplyv odľahlých hodnôt korunového zápoja a priemeru stromu na závislosť obžeru na nich. Na to som preložila regresnú priamku dátami s odľahlou hodnotou a bez nej a porovnávala ich vhodnosť. Potom som z dát odstránila pozorovanie, ktoré vytváralo odľahlú hodnotu v korunovom zápoji a opäť sa pokúsila zostaviť model rovnakým postupom aký je opísaný v predchádzajúcom odstavci.

Tak ako aj v iných už publikovaných pokusoch s rovnakým alebo podobným designom (napr. Asplund et al. 2010, Catalán et al. 2008, Sánchez et al. 2004, Schmidt & Schaefer 2004) som na otestovanie rozdielu miery preferencie (preferenčného indexu) medzi jednotlivými druhmi použila Hotellingov T^2 test (Morrison 1990), s nulovou hypotézou (H_0) že medzi skupinami nie je rozdiel. Funkcia je v programe R dostupná z balíčku ICSNP.

Hladina významnosti pre všetky testy bola opäť stanovená na $\alpha = 0,05$.

3. VÝSLEDKY

Všetky výsledné hodnoty boli zaokrúhlené na tri desatinné miesta.

3.1 TLC

Výsledky tenkovrstvej chromatografie zobrazuje tabuľka

Lišajník	Zistené látky	
	kortex	medula
<i>P. sulcata</i>	atranorin	kyselina salazinová
<i>P. saxatilis</i>	atranorin	kyselina salazinová, ± lobarová, ± norstiktová, ± protolichesterinová, ± lichesterinová, ± galbinová
<i>P. tiliacea</i>	atranorin	kyselina lekanorová
<i>M. glabratula</i>	–	kyselina lekanorová, skyrin
<i>M. subaurifera</i>	–	kyselina lekanorová
<i>M. glabra</i>	–	kyselina lekanorová
<i>M. exasperata</i>	–	–
<i>M. exasperatula</i>	–	–

Tab 3 Sekundárne metabolity zaznamenané v skúmaných lišajníkoch pomocou TLC.

M. exasperata a *M. exasperatula* žiadne sekundárne metabolity detekovateľné TLC neobsahovali. *P. saxatilis* bola chemicky variabilná, okrem atranorinu a kyseliny salazínovej sa v niektorých stielkach podarilo objaviť aj ďalšie látky, maximálne však tri. V *M. glabratula* sa okrem kyseliny lekanorovej a skyrinu často vyskytovala aj tretia látka, ktorú sa nepodarilo určiť. V jednej z testovaných položiek *M. glabratula* bola potvrdená len kyselina lekanorová. *P. tiliacea* obsahovala vždy atranorin a kyselinu lekanorovú. Avšak kyselina lekanorová vytvárala na doskách dva typy škvŕn, podľa tvaru jasne odlišiteľné. V stielkach *P. subaurifera* som potvrdila len kyselinu lekanorovú. Metabolity *P. sulcata* a *M. glabra* sa zhodovali s literatúrou.

3.2 Laboratórne pokusy

Vo všetkých založených komôrkach bola pozorovaná konzumácia lišajníkov slimákmi. Jeho miera sa líšila od 5 % pôvodnej váhy a 15 % pôvodnej plochy až po 100 % oboch u LM a 6 % váhy a 10 % plochy až po 97 % váhy a 91 % plochy u CC.

Tabuľka 4 zobrazuje výsledky párových t-testov alebo párovými Wilcoxonových testov, ktorými som sledovala, či je vymytá polovica oproti nevymytej preferovaná. V prípade, že bol použitý Wilcoxonov test, je v tabuľke uvedená V-štatistika, v prípade t-testu je to t-štatistika a počet stupňov voľnosti (df), v oboch prípadoch je uvedená p-hodnota.

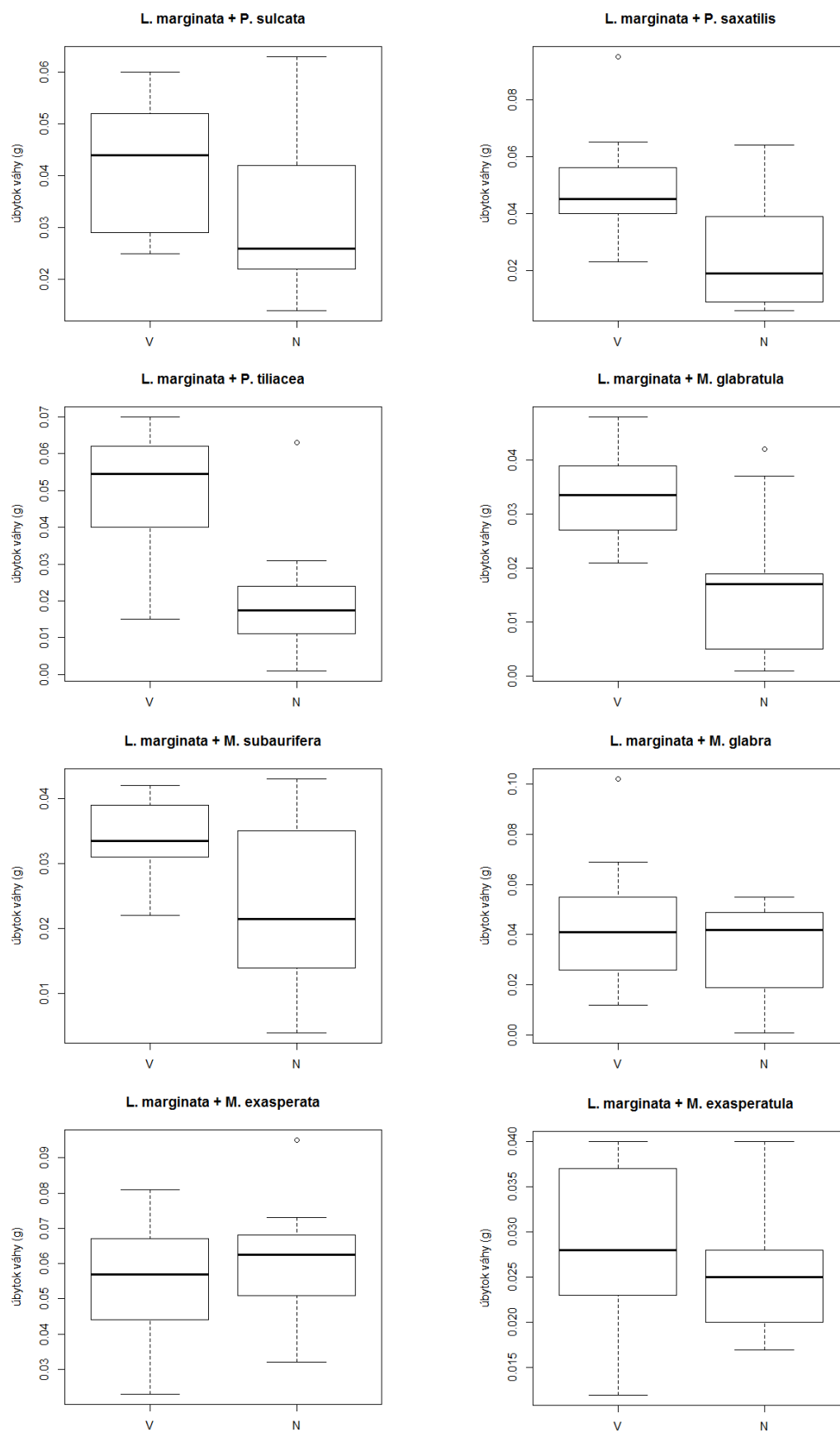
		Plocha				Váha			
		V	t	df	p	V	t	df	p
LM	sulc	47			0,024	35			0,077
	sax		2,209	9	0,027	47			0,024
	tili		5,776	9	< 0,001	54			0,002
	ful	54			0,002		3,343	9	0,004
	subau		3,57	9	0,002	51			0,007
	glab	39			0,138	30			0,204
	eta		0,184	9	0,858		-0,512	9	0,621
	ela		-0,486	9	0,638	27			0,635
CC	sulc	54			0,002	42			0,012
	sax	54			0,002	55			< 0,001
	tili	55			< 0,001	53			0,005
	ful	55			< 0,001	55			< 0,001
	subau	54			0,002	45			0,005
	glab	55			< 0,001	54			0,002
	eta	31			0,770		0,620	9	0,550
	ela		-0,871	9	0,406	28			1

Tab 4 Výsledky laboratórnych pokusov. V prípade Wilcoxonovho testu je uvedená V-štatistika, v prípade t-testu t-štatistika a počet stupňov voľnosti (df), v oboch prípadoch je uvedená p-hodnota. Štatisticky významné hodnoty sú zvýraznené tučne.

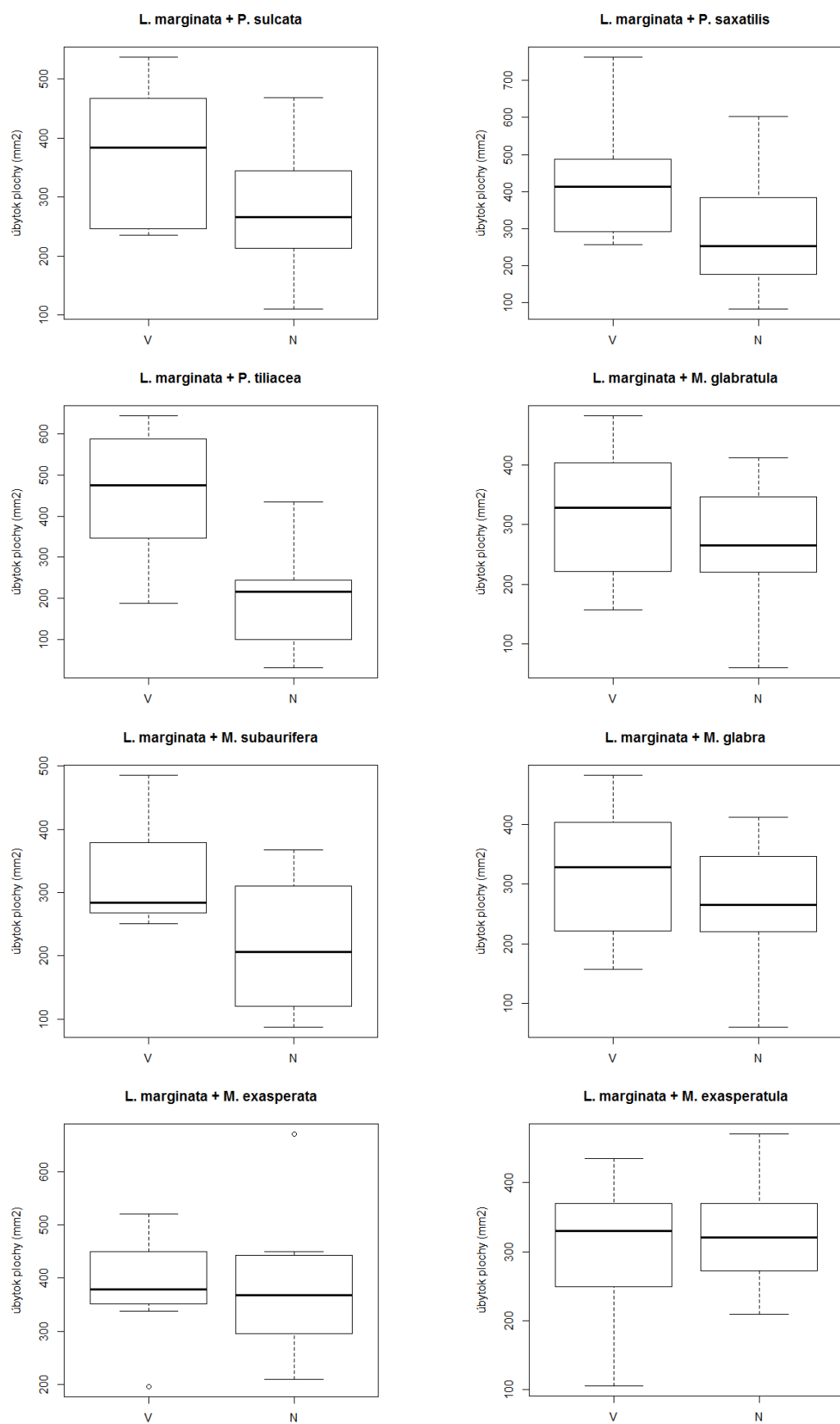
Z uvedených výsledkov je možné konštatovať, že na stanovenej hladine významnosti $\alpha = 0,05$ je všetkých 6 druhov lišajníkov obsahujúcich sekundárne metabolity štatisticky preukazne chránených voči *C. cerata* a to ako pri výpočtoch na základe plochy tak aj na základe váhy. Rovnaká situácia s *L. marginata* je v prípade SAX, TILI, FUL a SUBAU. Sekundárne metabolity GLAB slizniaka LM dostatočne neodpuďujú. V prípade SULC výsledok záleží na tom, ktorým spôsobom je počítaný. Ochrana na základe plochy je významná, na základe váhy však nie.

V prípade diskoviek bez sekundárnych metabolitov nevyšli testy v ani jednom prípade významne. Z toho môžeme predpokladať, že vymývanie acetónom nemalo na spásanie slimákmi významný vplyv.

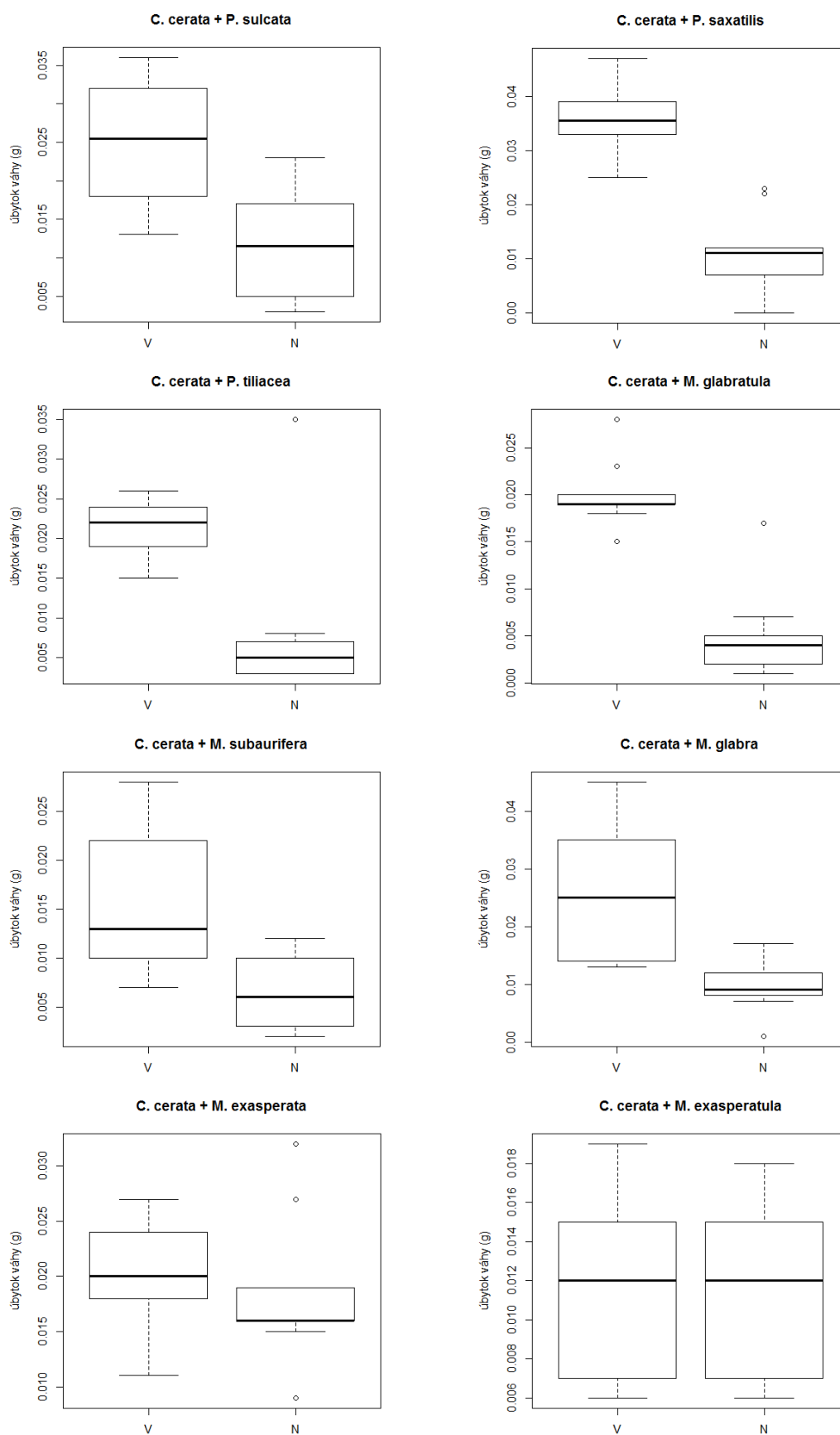
Výsledky sú graficky znázornené na nasledujúcich krabicových grafoch (obr. 11-14).



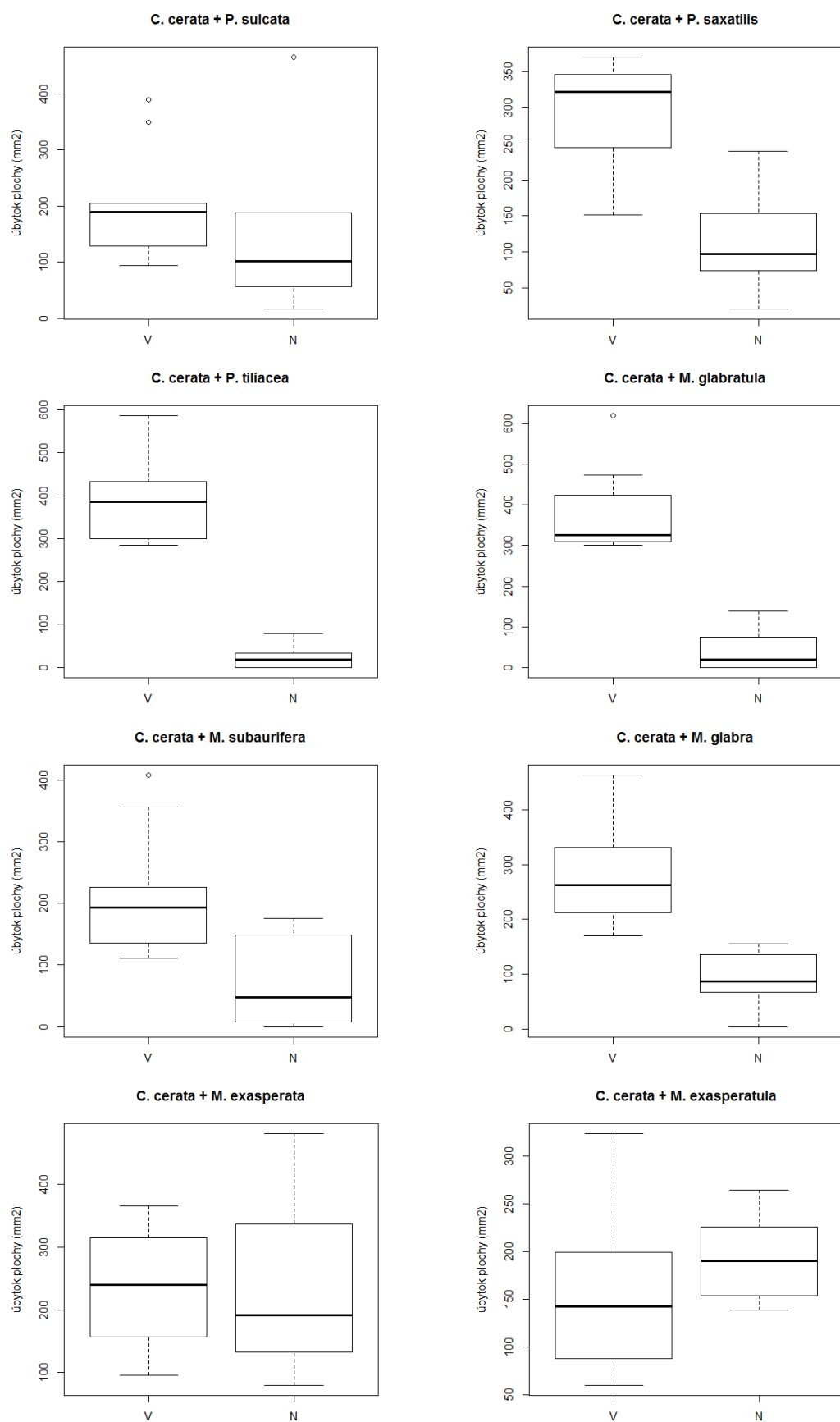
Obr 11 Porovnanie úbytku hmotnosti v gramoch medzi vymytou (V) a nevymytou (N) časťou stielky v pokusoch s *L. marginata*.



Obr 12 Porovnanie úbytku plochy v mm² medzi vymytou (V) a nevymytou (N) časťou stielky v pokusoch s *L. marginata*.



Obr 13 Porovnanie úbytku hmotnosti v gramoch medzi vymytou (V) a nevymytou (N) časťou stielky v pokusoch s *C. cerata*.

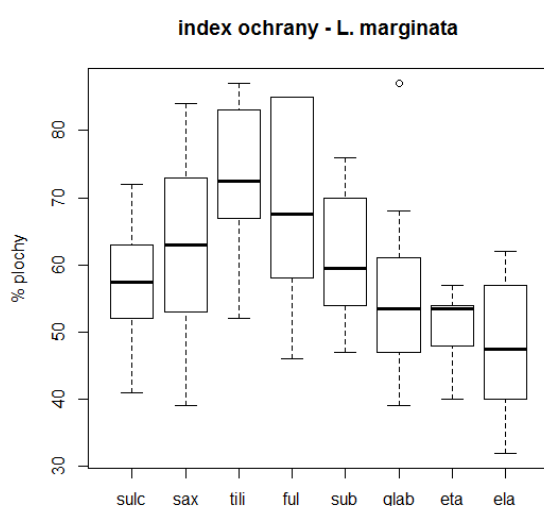


Obr 14 Porovnanie úbytku plochy v mm² medzi vymytou (V) a nevymytou (N) časťou stielky v pokusoch s *C. cerata*.

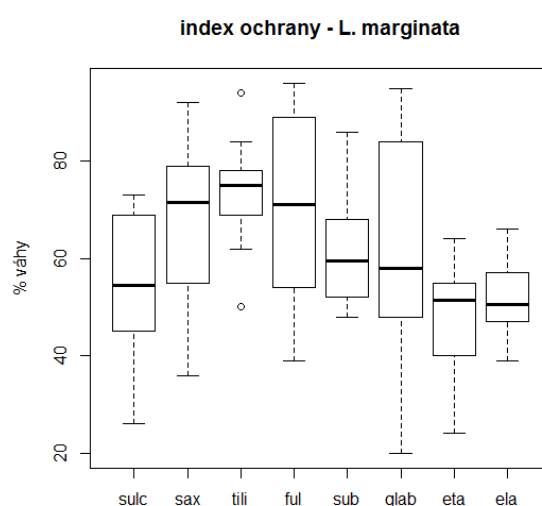
Nasledujúca tabuľka (tab. 5) zobrazuje priemerné hodnoty indexu miery ochrany. Rozptyl hodnôt je zobrazený krabicovými diagramami (obr.15-18).

Priem. index		sulc	sax	tili	ful	subau	glab	eta	ela
LM	plocha	0,573	0,623	0,712	0,684	0,63	0,563	0,507	0,525
	váha	0,578	0,674	0,734	0,711	0,629	0,6	0,482	0,505
CC	plocha	0,617	0,722	0,944	0,916	0,772	0,79	0,556	0,476
	váha	0,683	0,769	0,798	0,821	0,7	0,709	0,527	0,446

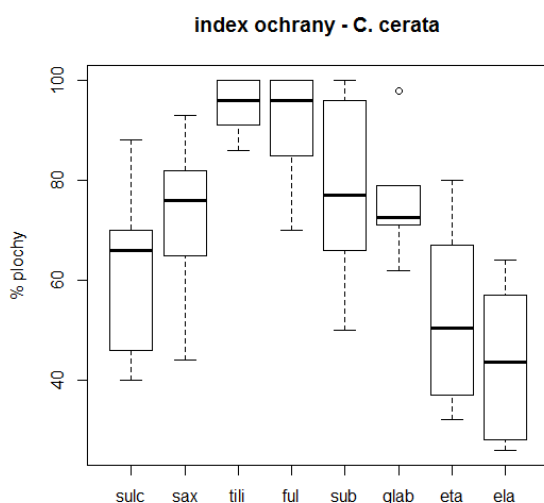
Tab 5 Priemerné hodnoty indexu ochrany.



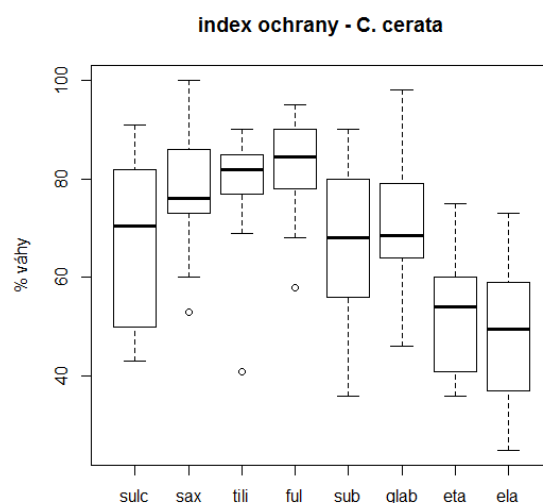
Obr 15 Index ochrany lišajníkových látok voči *L. marginata* vyjadrený v percentách plochy.



Obr 18 Index ochrany lišajníkových látok voči *L. marginata* vyjadrený v percentách plochy.



Obr 16 Index ochrany lišajníkových látok voči *C. cerata* vyjadrený v percentách plochy.



Obr 17 Index ochrany lišajníkových látok voči *C. cerata* vyjadrený v percentách plochy.

Ako je vidieť z grafov, priemerná hodnota ochrany u ETA a ELA sa pohybuje okolo 0,5 voči obom druhom slimákov, tak ako sa pôvodne predpokladalo.

U slizniaka LM podobné hodnoty pozorujem aj pre SULC a GLAB, čo nie je prekvapivé, keďže odpudivosť látok týchto dvoch druhov nebola štatisticky preukázaná (viď tab. 4). Najvyššie hodnoty indexu dosahujú TILI a FUL, takže sa dá predpokladať, že spomedzi týchto druhov sú najlepšie chránené. U CC sú výraznejšie rozdiely medzi indexami počítanými na základe váhy a plochy. V oboch prípadoch sú však tiež najvyššie pre FUL a TILI. Zvyšné štyri druhy (SULC, SAX, SUBAU, GLAB) dosahujú (medzi sebou podobné) nižšie hodnoty, ktoré sú ale vyššie než pre ETA a ELA a indikujú určitú ochranu.

	LM		CC	
	plocha	váha	plocha	váha
eta-ela	FALSE	1	FALSE	FALSE
fulig-ela	FALSE	0,1	TRUE	TRUE
glab-ela	FALSE	0,894	FALSE	FALSE
sax-ela	FALSE	0,292	FALSE	TRUE
subau-ela	FALSE	0,684	FALSE	FALSE
sulc-ela	FALSE	0,999	FALSE	FALSE
tili-ela	FALSE	0,045	TRUE	TRUE
fulig-eta	FALSE	0,046	TRUE	TRUE
glab-eta	FALSE	0,739	FALSE	FALSE
sax-eta	FALSE	0,158	FALSE	FALSE
subau-eta	FALSE	0,477	FALSE	FALSE
sulc-eta	FALSE	0,986	FALSE	FALSE
tili-eta	TRUE	0,019	TRUE	TRUE
glab-fulig	FALSE	0,783	FALSE	FALSE
sax-fulig	FALSE	0,999	FALSE	FALSE
subau-fulig	FALSE	0,946	FALSE	FALSE
sulc-fulig	FALSE	0,326	TRUE	FALSE
tili-fulig	FALSE	1	FALSE	FALSE
sax-glab	FALSE	0,969	FALSE	FALSE
subau-glab	FALSE	0,999	FALSE	FALSE
sulc-glab	FALSE	0,996	FALSE	FALSE
tili-glab	FALSE	0,587	FALSE	FALSE
subau-sax	FALSE	0,998	FALSE	FALSE
sulc-sax	FALSE	0,653	FALSE	FALSE
tili-sax	FALSE	0,991	FALSE	FALSE
sulc-subau	FALSE	0,948	FALSE	FALSE
tili-subau	FALSE	0,830	FALSE	FALSE
tili-sulc	FALSE	0,180	TRUE	FALSE

Tab 6 Párové testovanie indexov ochrany. V prípade LM_vh ide o výsledky Tukeyho testu, v ostatných prípadoch post-hoc testov ku Kruskal-Wallisovmu testu (TRUE – $p < 0,05$, FALSE – $p > 0,05$). Signifikantné výsledky sú zvýraznené tučne.

Výsledok analýzy rozptylu (ANOVA) pre LM_váha ($F = 3,274$, $df = 7$, $p = 0,004$) aj Kruskal-Wallisových testov pre LM_plocha (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 19,4$, $df = 7$, $p = 0,007$), CC_váha (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 33,340$, $df = 7$, $p < 0,001$) a CC_plocha (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 38,284$, $df = 7$, $p < 0,001$) potvrdil rozdielnosť indexov pre jednotlivé druhy lišajníkov u oboch slimákov bez ohľadu na to, či sú vyjadrené na základe váhy alebo plochy.

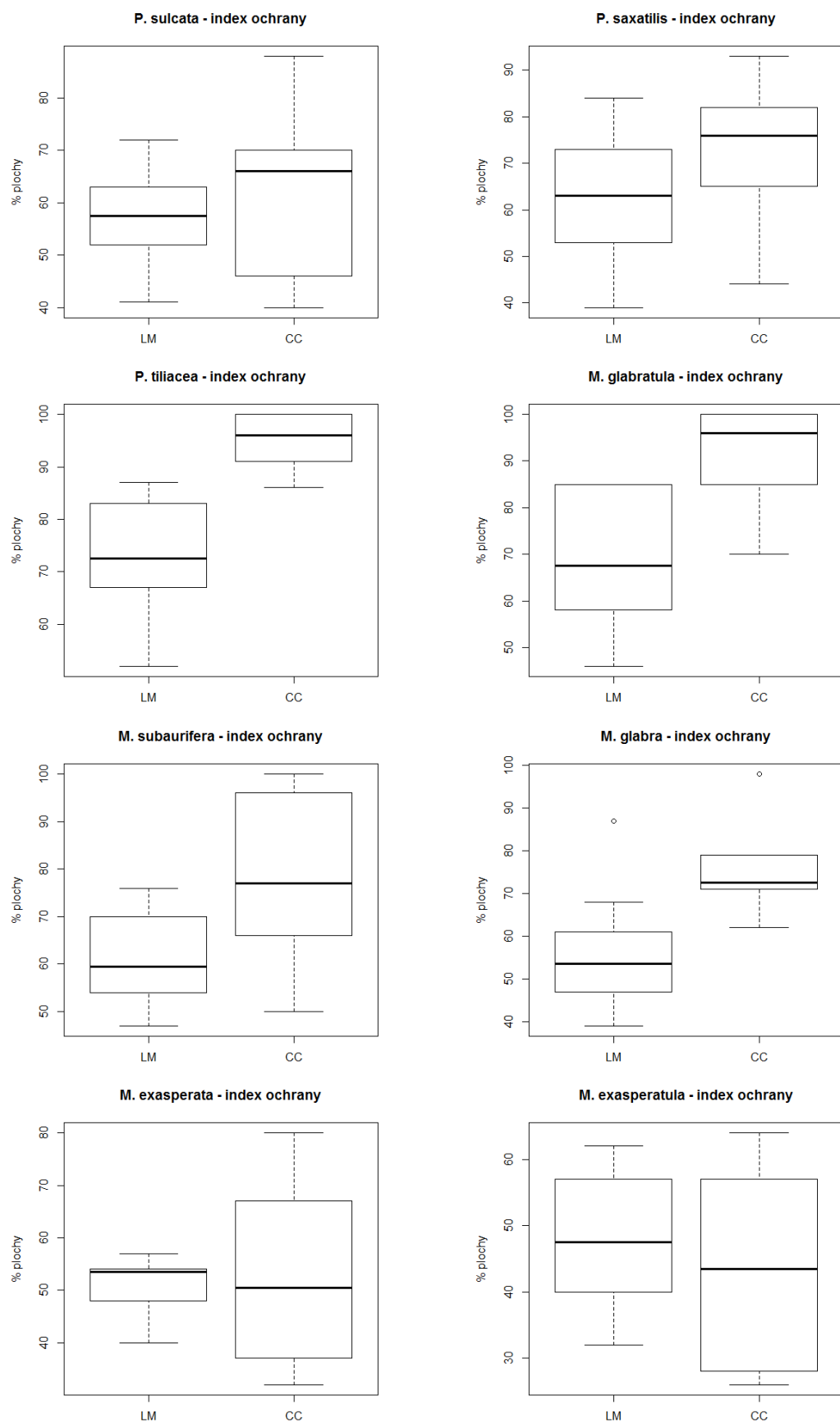
Ako zobrazuje tabuľka (tab. 6), v post-hoc mnohonásobných porovniach vychádza signifikante len malý počet dvojíc. V podstate sa štatisticky preukazne líšia hodnoty indexu ochrany len medzi dvoma nechránenými druhmi ETA, ELA a najlepšie chránenými TILI a FUL. U CC sa okrem toho na základe váhy od dobre chránených FUL a TILI líši aj SULC, na základe plochy zase SAX od ELA.

V nasledujúcej tabuľke (tab. 7) sú uvedené výsledky formálneho testovania rozdielu vplyvu látok jedného druhu lišajníku na oba slimáky. V prípade t-testu je v tabuľke uvedená t-štatistika a počet stupňov voľnosti (df), v prípade, že bol použitý Wilcoxonov test, je v tabuľke uvedená W-štatistika, v oboch prípadoch je uvedená p-hodnota.

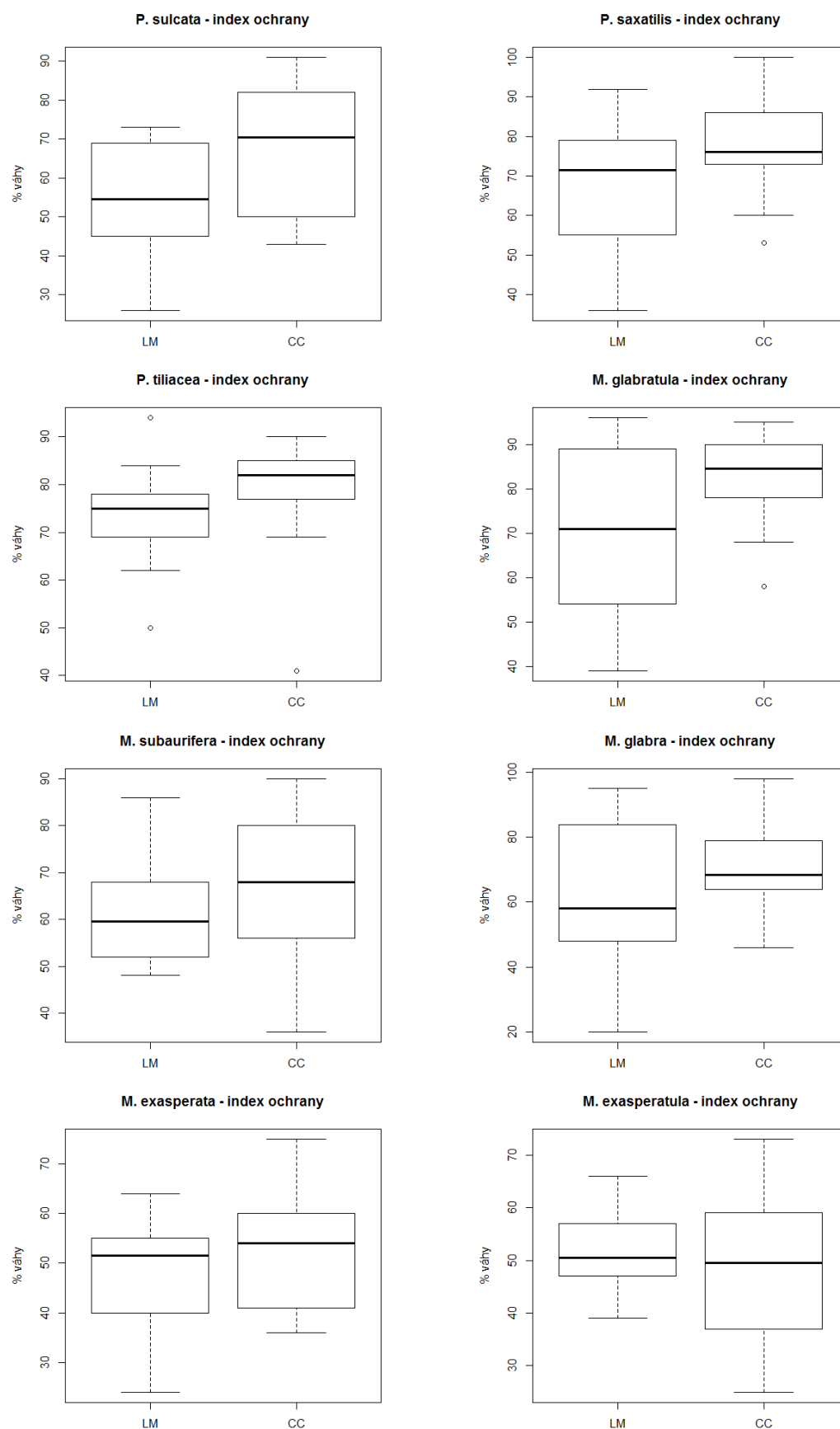
	Plocha				Váha			
	W	t	df	p	W	t	df	p
sulc		0,634	13,058	0,537		1,858	17,701	0,080
sax		1,512	17,847	0,148		1,347	16,729	0,196
tili	98			< 0,001	73			0,089
ful	93			0,001	64			0,315
subau	73			0,089		1,175	16,976	0,256
glab	91			0,001		1,246	14,276	0,233
eta	48			0,912		0,854	17,998	0,404
ela	40			0,481	46			0,796

Tab 7 Výsledky testovania rozdielu vplyvu látok jedného druhu lišajníku na oba slimáky. V prípade t-testu je uvedená t-štatistika a počet stupňov voľnosti (df), v prípade Wilcoxonovho testu W-štatistika, v oboch prípadoch je uvedená p-hodnota.

Na stanovenej hladine významnosti $\alpha = 0,05$ môžeme signifikantný rozdiel v efekte ochrany lišajníku na CC a LM konštatovať len v prípadoch TILI, FUL a GLAB a aj to len pri výpočtoch na základe plochy. Ako je vidieť na krabicových diagramoch na obr. 19 a 20, vo všetkých troch prípadoch odpudzujú metabolity CC silnejšie než LM. Metabolity SULC, SAX a SUBAU majú pravdepodobne rovnaký efekt na CC aj LM. U druhov bez metabolitov ETA, ELA tiež nebol potvrdený žiadny rozdiel.



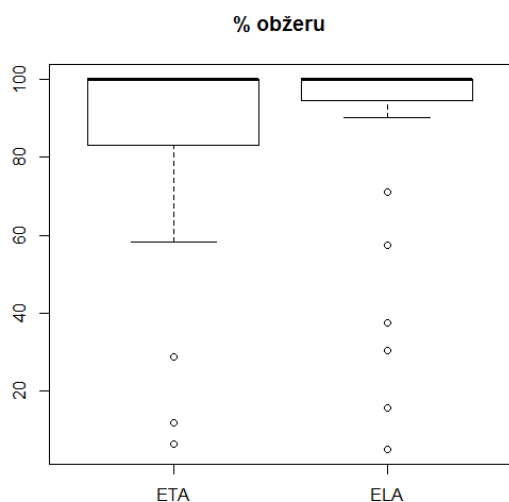
Obr 19 Porovnanie indexu ochrany vyjadreného v percentách plochy voči *L. marginata* a *C. cerata*.



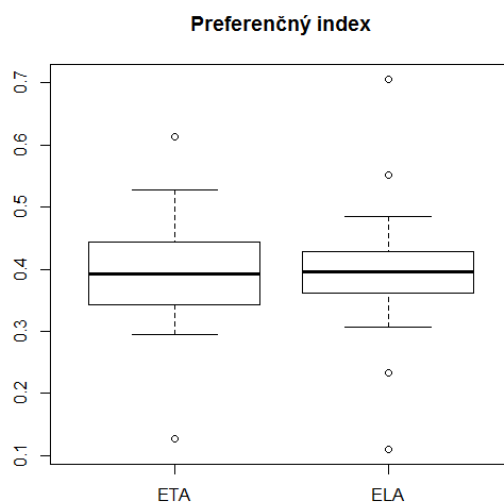
Obr 20 Porovnanie indexu ochrany vyjadreného v percentách váhy voči *L. marginata* a *C. cerata*.

3.3 Transplantačný pokus

ETA a ELA sa štatisticky signifikantne nelíšia (obr. 21 a 22) ani v percente obžeru ($V = 32$, $p = 0,684$) ani v hodnote indexu preferencie ($V = 24$, $p = 0,760$). Preto v ďalších výpočtoch budem operovať už len s kategóriou MEL.



Obr 21 Porovnanie percent obžeru *M. exasperata* a *M. exasperatula* v transplantačnom pokuse.

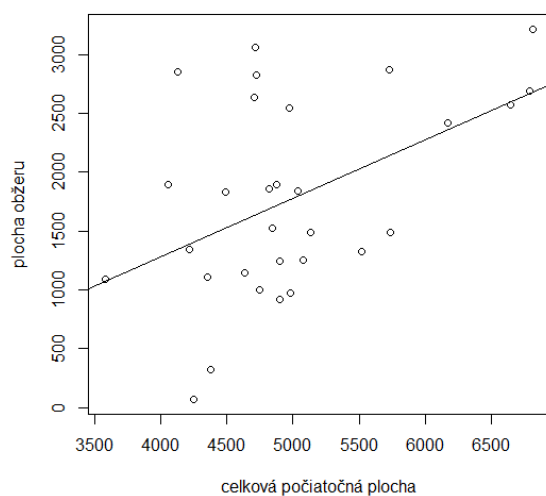


Obr 22 Porovnanie preferenčných indexov *M. exasperata* a *M. exasperatula* v transplantačnom pokuse.

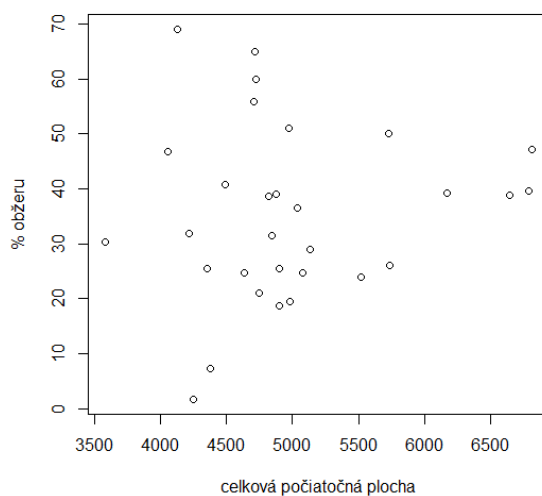
Spásanie bolo zaznamenané na všetkých transplantovaných mriežkach. Na 19 bolo zožratých 100 % z MEL, na štyroch 0 % FUL a na štyroch 0 % SULC (jedna tá istá, tri rôzne).

Absolútny celkový obžer stúpa s počiatočnou plochou ($F_{(1, 28)} = 8,174$, $p = 0,008$) a to podľa závislosti $y = 0,496x - 703,587$ (obr. 23). Naopak, miera celkového obžeru v percentách (obr. 24) je nezávislá na počiatočnej ploche ($F_{(1, 28)} = 0,342$, $p = 0,563$). V ďalších výpočtoch som používala už len mieru obžeru v percentách.

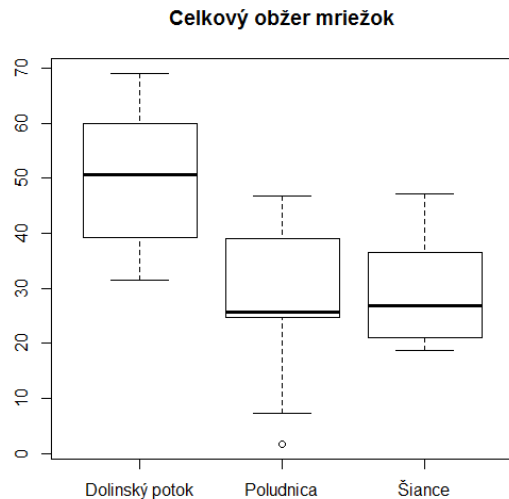
Najnižší zaznamenaný celkový obžer na mriežke bol 1,72 % (Poludnica), najvyšší 69,01 % (Dolinský potok) a priemerný 35,3 %. Celkový obžer mriežok sa medzi jednotlivými lokalitami líšil ($F_2 = 11,11$, $p < 0,001$), konkrétne Poludnica i Šiance sa líšili od Dolinského potoka ($t = -4,282$, $p < 0,001$ a $t = -3,847$, $p = 0,002$), medzi sebou však nie ($t = 0,435$, $p = 0,901$) (obr. 25). Vzťah celkového obžeru a korunového zápoja, priemeru stromu a veľkosti báze stromu graficky zobrazujú obr. 26-28.



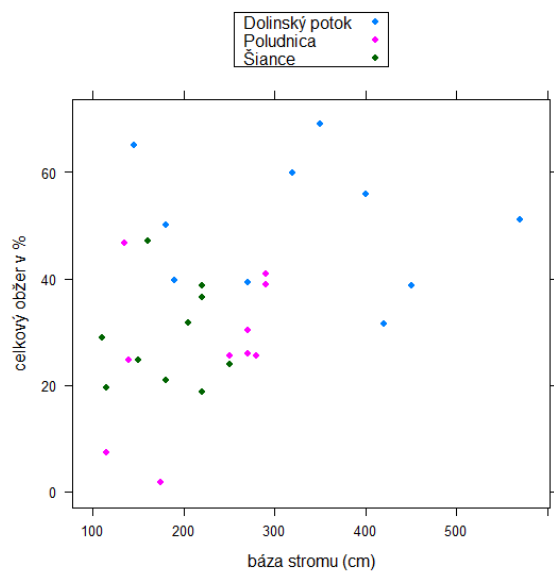
Obr 23 Závislosť plochy celkového obžeru na počiatkovej ploche stielok celkovo na mriežke.



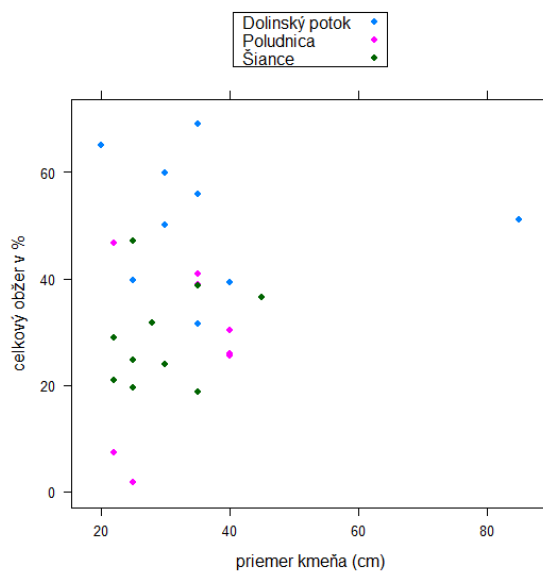
Obr 24 Závislosť celkového percentuálneho obžeru (z počiatkovej plochy) na počiatkovej ploche celkovo na mriežke.



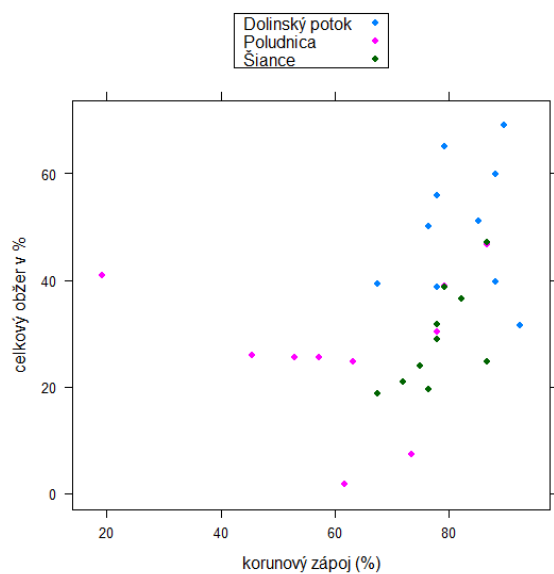
Obr 25 Porovnanie celkového obžeru mriežok (v percentách) na jednotlivých lokalitách.



Obr 26 Vzťah celkového obžeru na mriežke v % a veľkosti obvodu bázy stromu.

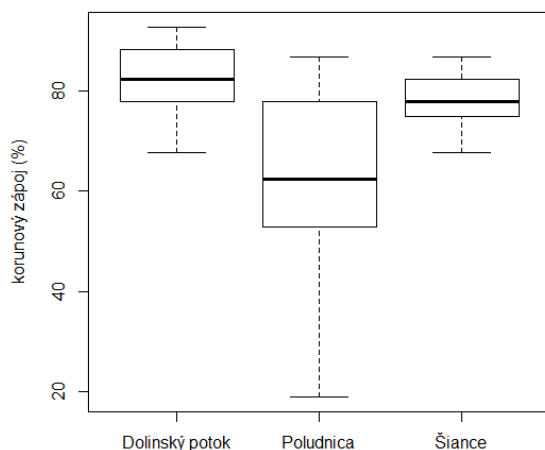


Obr 27 Vzťah celkového obžeru na mriežke v % a priemeru stromu vo výške 110 cm.



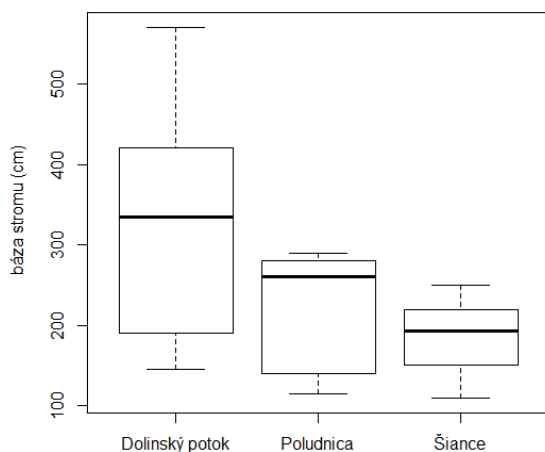
Obr 28 Vzťah celkového obžeru na mriežke v % a korunového zápoja.

Korunový zápoj sa medzi lokalitami (obr. 29) signifikantne líši (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 9,050$, $df = 2$, $p = 0,011$). Konkrétne na stanovenej hladine významnosti $\alpha = 0,05$ je významný rozdiel len medzi Dolinským potokom (priemer 82,3 %) a Poludnicou (62,5 %) (Šiance 77,9 %).

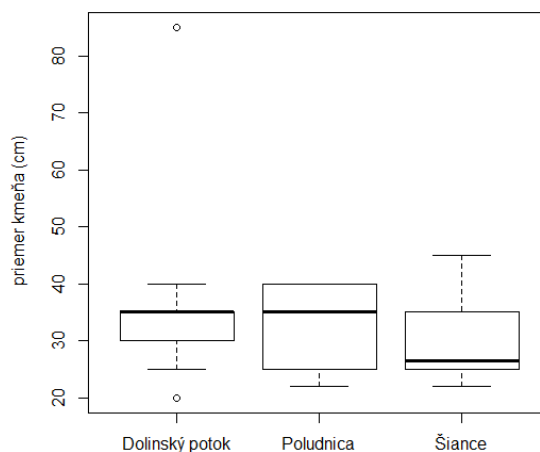


Obr 29 Hodnoty korunového zápoja na jednotlivých lokalitách.

Čo sa týka meraných charakteristík stromu, veľkosť báze sa medzi lokalitami líši (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 7,810$, $df = 2$, $p = 0,0201$) a to konkrétne len medzi Dolinským potokom (priemer 335 cm) a Šiancami (193 cm) ($p < 0,05$). Poludnica s priemernou hodnotou 260 cm sa od zvyšných dvoch lokalít nelíši (obr. 30). Priemer kmeňa vo výške 110 cm (Dolinský potok 35 cm, Poludnica 35 cm, Šiance 26,5 cm) sa medzi lokalitami štatisticky preukazne nelíši (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 1,641$, $df = 2$, $p = 0,440$) (obr. 31).



Obr 31 Hodnoty veľkosti báze stromu na jednotlivých lokalitách.



Obr 30 Hodnoty priemeru kmeňa stromu na jednotlivých lokalitách.

Počiatkový model na vysvetlenie celkového obžeru pomocou meraných premenných nemá preukazný výsledok ($\text{adj.-}R^2 = 0,245$, $F_{14,15} = 1,672$, $p = 0,167$). Výsledky analýzy rozptylu modelu zobrazuje tabuľka 8.

Model 1	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
can_clo	1	867,49	867,49	4,595	0,049	*
strom_báza	1	963,87	963,87	5,106	0,039	*
strom_priem	1	71,56	71,56	0,380	0,547	
lokalita	2	1430,40	715,20	3,788	0,047	*
strom_báza:strom_priem	1	44,01	44,01	0,233	0,636	
can_clo:lokalita	2	334,50	167,25	0,886	0,433	
strom_báza:lokalita	2	516,23	258,11	1,367	0,285	
strom_priem:lokalita	2	120,89	60,45	0,320	0,731	
strom_báza:strom_priem:lokalita	2	69,88	34,94	0,185	0,833	
Residuals	15	2831,87	188,79			

Tab 8 Výsledky počiatkového modelu na vysvetlenie celkového obžeru pomocou meraných premenných.

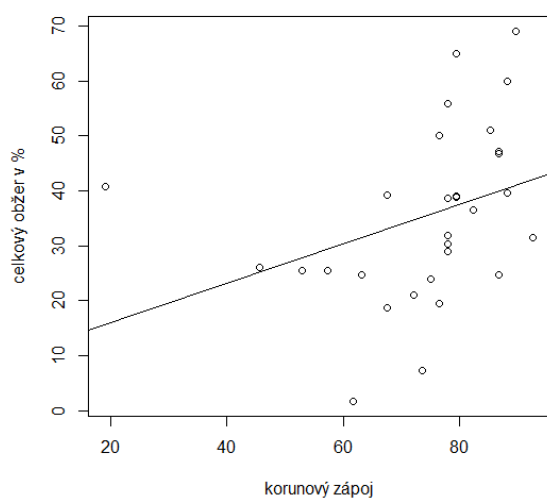
Postupne som z modelu odstránila trojitú a všetky dvojité interakcie. Potom som odstránila aj priemer stromu, ktorý bol naďalej nepreukazný. Ich odstránenie nespôsobilo v modeli signifikantnú zmenu ($F_{25} = 0,5816$, $p = 0,8051$). V modeli ($\text{adj. } R^2 = 0,371$, $F_{4,25} = 5,231$, $p = 0,003$) teda zostali tri zložky: lokalita, korunový zápoj a veľkosť báz stromu, všetky tri sa javili signifikanté (tab. 9).

Model 2	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
can_clo	1	867,5	867,5	5,519	0,027	*
strom_báza	1	963,9	963,9	6,132	0,020	*
lokalita	2	1489,5	744,73	4,738	0,018	*
Residuals	25	3929,9	157,2			

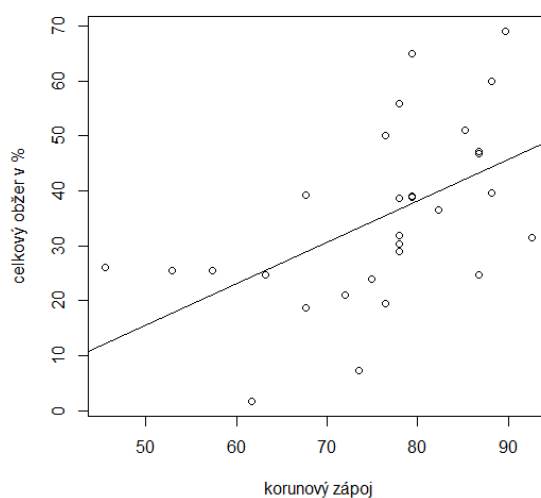
Tab 9 Výsledky modelu po odstránení interakcií a priemeru stromu.

Avšak ani odstránenie báze stromu a následne korunového zápoja nespôsobilo v modeli významnú zmenu ($p = 0,805$ a $p = 0,619$), naopak po ich odstránení sa jemne zvýšila „adjusted R-squared“ hodnota, ktorá ukazuje mieru vysvetlenej variability (z 0,37 na 0,39 a 0,41). Zdalo by sa preto, že najvhodnejším modelom na vysvetlenie celkového obžeru je jednoduchá analýza rozptylu, ktorej výsledok je zobrazený na začiatku tejto kapitoly.

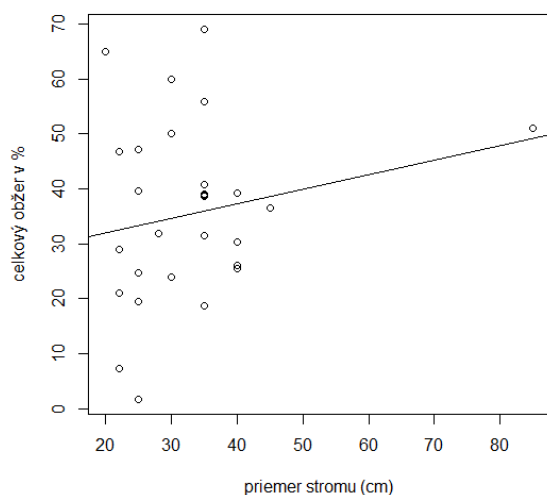
Pri pohľade na grafické znázornenie závislosti celkového obžeru na korunovom zápoji (obr. 32) sa ponúka myšlienka, že pozorovaná odľahlá hodnota (19 %) môže skresľovať celkový model. Regresná priamka sedí na dátach omnoho lepšie po jej odstránení (obr. 33). Na rozdiel od regresie zostavenej na základe pôvodných dát ($\text{adj. } R^2 = 0,088$, $F_{1,28} = 3,805$, $p = 0,061$) je výsledok lineárnej regresie na dátach bez odľahlej hodnoty signifikantný ($F_{1,27} = 10,8$, $p = 0,003$) a vysvetľuje 25,93 % variability.



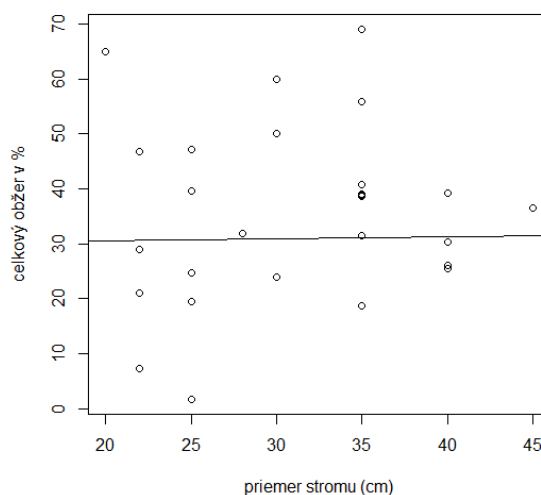
Obr 34 Závislosť celkového obžeru mriežky v % na korunovom zápoji zostavená na základe všetkých dát.



Obr 35 Závislosť celkového obžeru mriežky v % na korunovom zápoji zostavená na základe dát bez odľahlej hodnoty.



Obr 32 Závislosť celkového obžeru mriežky v % na priemere kmeňa stromu zostavená na základe všetkých dát.



Obr 33 Závislosť celkového obžeru mriežky v % na priemere kmeňa stromu zostavená na dátach bez odľahlej hodnoty.

Podobné podozrenie vzniká aj pri pohľade na priemer stromu (obr. 26). Avšak ani použitie

všetkých dát ($p = 0,285$) ani dát bez odľahlej hodnoty ($p = 0,665$) neposkytuje preukazný výsledok (obr. 34, 35).

Na základe týchto poznatkov som model vysvetľujúci obžer zostavila znovu, tentokrát s vynechaním pozorovania s odľahlou hodnotou korunového zápoja. Rovnakým postupom ako v predchádzajúcom prípade, postupným zjednodušovaním najzložitejšieho modelu, som sa dostala k modelu, v ktorom je obžer vysvetlený len lokalitou a korunovým zápojom (tab. 10). Vysvetľuje 49,29 % variability ($F_{3,25} = 10,07$, $p < 0,001$).

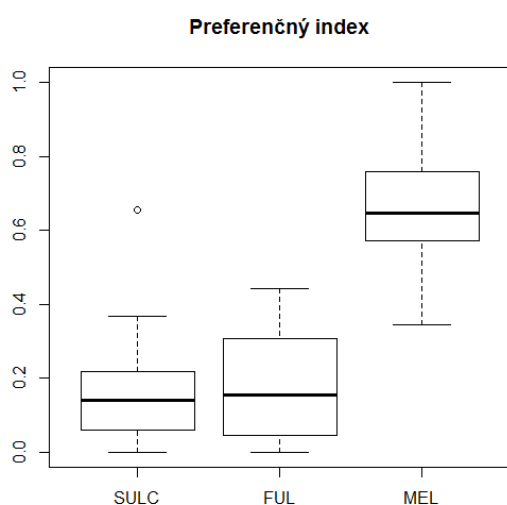
Model 3	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
can_clo	1	2062,7	2062,7	15,776	< 0,001	***
lokalita	2	1887,8	943,89	7,219	< 0,001	**
Residuals	25	3268,7	130,75			

Tab 10 Výsledok konečného modelu.

Ďalšie zjednodušovanie modelu ho už len zhoršilo. Odstránenie korunového zápoja znížilo mieru vysvetlenej variability na 43,93 % ($F_{2,26} = 11,97$, $p < 0,001$, porovnanie s modelom 3: $p = 0,064$), odstránenie lokality len na 25,93 % ($F_{2,26} = 10,08$, $p = 0,003$, porovnanie s Modelom 3: $p = 0,003$).

Model 3, pozostávajúci z korunového zápoja a lokality, vzniknutý na základe odstránenia odľahlej hodnoty v korunovom zápoji považujem za najvhodnejší na vysvetlenie celkového obžeru na mriežke.

Rozdiely v spásaní (v preferenčnom indexe) pozorované medzi jednotlivými lišajníkmi na mriežkach (obr. 36) neboli náhodné ($T^2_{1,89} = 134,037$, $p < 0,001$). *Melanohalea* bola najpreferovanejšia (priemerne 66,1 % celkového obžeru mriežky), *P. sulcata* (15,6 %) a *M. glabratula* (18,1 %) boli na tom približne rovnako.



Obr 36 Preferenčný index troch skupín lišajníkov v transplantačnom pokuse.

4. DISKUSIA

4.1 TLC

Pre väčšinu lišajníkov boli preukázané látky zhodné s látkami uvádzanými v literatúre. Pre *P. saxatilis* bola potvrdená chemická variabilita. Podarilo sa v nej nájsť takmer všetky látky uvádzané pre tento druh v rôznej literatúre. Nenašla som jedine kyselinu protocetrarovú. Nepotvrdila som ani chloratranorin a kyselinu konsalazinovú, tie je však metódou TLC veľmi náročné od atranorinu a kyseliny salazínovej odlišiť (Orange et al. 2008). Okrem toho sa v niekoľkých stielkach vyskytovala aj kyselina protolichesterinová a v jednej stielke pravdepodobne kyselina galabinová. Kyselina protolichesterinová je údavaná z diskovky *P. ernstiae* (Thell & Moberg 2011), ktorej odlišenie od *P. saxatilis* nie je úplne jednoznačné. Kyselina galabinová je známa z blízkeho druhu *P. omphalodes* (Thell & Moberg 2011). V prípade *M. glabratula* sa často na TLC doske od škvrny kyseliny lekanorovej dala rozlíšiť ďalšia látka, ktorú som neurčila. Pravdepodobne sa bude jednať o jej derivát. Smith et al. (2009) z tohto druhu tiež uvádzajú neznáme látky. Kyselinu 5-metoxylekanorovú, ktorú z *M. glabratula* uvádzajú Elix & Vilas (2003), sa nepodarilo potvrdiť. U *P. tiliacea* kyselina lekanorová vytvárala dva jasne odlišné typy škvŕn, ktoré sa ale všetkými ostatnými vlastnosťami zhodovali. Opäť sa môže jednať o neznámy derivát kyseliny lekanorovej, na druhej strane môže ísť len o odchýlku. Subauriferin, žltý pigment *M. subaurifera*, potvrdený nebol. *M. exasperata* a *M. exasperatula* neobsahovali žiadne látky. Bolo dôležité overiť si túto informáciu pred ďalšími pokusmi.

4.2 Vymývanie sekundárnych metabolitov acetónom

U *M. exasperata* a *M. exasperatula*, druhov bez sekundárnych metabolitov, nebol preukázaný rozdiel v spásaní vymývanej a nevymývanej polovice. Môžeme to považovať za úspešnú kontrolu toho, že ošetrovanie acetónom použitou metodikou príťažlivosť stielok neznižuje, čo je základný predpoklad použitia tejto techniky v ekologických pokusoch (napr. Gauslaa 2005, Hyvärinen et al. 2000, Reutiman & Scheidegger 1987, Lawrey 1983).

Efektivita vymývania metabolitov z druhov použitých v mojich pokusoch nie je známa, výsledky však ukazujú, že zníženie ich obsahu je dostatočné na preukázanie ich odpudivosti. Navyše, použité druhy lišajníkov sú si blízko príbuzné (Crespo et al. 2010, Blanco et al. 2006), anatomicky podobné a obsahujú len obmedzený počet relatívne podobných látok. Preto by sa dalo predpokladať, že efektivita extrakcie bude u nich podobná. Každopádne zníženie koncentrácie metabolitov bolo v uskutočnených pokusoch dostatočné na preukázanie ochrannej funkcie sekundárnych metabolitov. Použitú metodiku teda rozhodne považujem za vhodnú pre použité kombinácie druhov.

4.3 Vyhodnocovanie pokusov

Pokusy boli vyhodnocované na základe plochy a hmotnosti. Výhody a nevýhody oboch metód som prebrala už v kapitole 2.3.5. Nakoniec sa však významnosť výsledkov pokusov medzi oboma spôsobmi vyhodnocovania líšila v jedinom prípade (*L. marginata* + *P. sulcata*).

Hodnoty váhy a plochy boli navzájom korelované (dáta nie sú zobrazené). Nepresnosti spôsobené prekryvom lalokov alebo nedokonalým vyčistením stielky pravdepodobne neboli závažné. V transplantáčnom pokuse som teda mohla použiť už len vyhodnocovanie na základe plochy.

4.4 Ochranná rola sekundárnych metabolitov

Ochranná funkcia sekundárnych metabolitov u všetkých šiestich lišajníkov bola preukázaná. Výnimkou sú *M. glabra*, ktorá pravdepodobne obsahuje príliš nízku koncentráciu kyseliny lekanorovej na to, aby odpudzovala *L. marginata* a *P. sulcata*, ktorej odpudivosť látok voči *L. marginata* nie je jednoznačná. Ak však slizniaka odpudzuje, je to len v malej miere. Metabolity oboch však odpudzujú *C. cerata*. O tom, ktoré látky sú za ochranu konkrétne zodpovedné, sa dá z výsledkov týchto pokusov len domnievať.

Primárnou funkciou kortikálnych lišajníkových látok alebo pigmentov je vo všeobecnosti pravdepodobne ochrana fotobionta voči nadmernému viditeľnému a UV-B žiareniu (McEvoy et al. 2006, Solhaug & Gauslaa 2006, Lawrey 1989). Na druhej strane napr. Solhaug et al. (2009) ukázali, že UV-B poškodzuje fotosystém rias až v neprirodzene vysokých dávkach. Koncentrácia kortikálnych metabolitov a pigmentov sa všeobecne zvyšuje s exponovanosťou stanovišťa (napr. Solhaug et al. 2009, Nybakken et al. 2007).

Atranorin, ktorý sa nachádza v kôre diskoviek *P. sulcata*, *P. saxatilis* a *P. tiliacea*, je jednou z najbežnejších lišajníkových kortikálnych látok (Smith et al. 2009). Kryštály atranorinu odrážajú fotosynteticky aktívne žiarenie (Solhaug et al. 2010). Jeho koncentrácia sa však v dutohlávkach nemení v závislosti na kvalite žiarenia (Nybakken & Julkunen-Tiitto 2006). Boli dokázané aj antiherbivórne účinky atranorinu – odpudzuje chrobáka *Lasioderma serricone* (Nimis & Skert 2006) a spomaľuje rast lariev mory *Spodoptera littoralis* (Giez et al. 1994). Na larvy *Eilema depressum* má atranorin pravdepodobne len malý vplyv – ak boli larvy živé *Hypogymnia physodes* neprežili (čo autori pripísali kyseline fysodovej), ale na *P. sulcata* sa ich rast len spomalil (Pöykkö et al. 2005). Lišajníky obsahujúce atranorin boli po vymytí acetónom príťažlivejšie pre roztoča *Fuscozetes setosus* (Reutiman & Scheidegger 1987) a väčšina aj pre slimáka *Cepaea hortensis* (Gauslaa 2005), v týchto prípadoch sa však jednalo o vymytie všetkých metabolitov, preto je ťažké robiť závery o efekte atranorinu samotného. Okrem toho má atranorin, aspoň v laboratórnych podmienkach, aj antibakteriálne (Neeraj et al. 2011) a antifungálne účinky (Goel et al. 2011).

V mojich pokusoch som síce čistý atranorin netestovala, zdalo by sa však, že slimáky odpudzuje. Ak by to tak nebolo, predpokladám, že by sa púšťali do vrchných vrstiev (vrchná kôra a vrstva fotobionta) nevymytých polovic *P. sulcata*, *P. tiliacea* a *P. saxatilis* rovnako ako do vymytých. V pokusoch som síce zaznamenala prípady spásania len vrchných častí nevymytej polovice, ale vždy to boli skôr len náznaky, v omnoho menšej miere než spásanie na polovici bez metabolitov.

Medulárne látky majú v lišajníkoch pravdepodobne iné funkcie než ochranu voči žiareniu. Ako už bolo spomenuté v úvode, okrem obrany voči herbivorom to môže byť ochrana voči patogénom, chelácia kovov alebo môžu plniť rôzne fyziologické funkcie.

Kyselina lekanorová, hlavný alebo jediný medulárny sekundárny metabolit *M. glabratula*, *M. subaurifera*, *M. glabra* a *P. tiliacea*, je tiež bežná a rozšírená u mnohých skupín lišajníkov (Smith et al. 2009). Nimis a Skert (2006) predpokladajú, že odpudzuje *L. serricone*. Ďalej mala kyselina lekanorová v laboratórnych pokusoch antioxidačné (Lou et al. 2009) a antibakteriálne účinky (Neeraj et al. 2011). Nič viac nie je o funkciách tejto látky známe. V mojich pokusoch kyselina lekanorová slimáky viditeľne odpudzuje. *M. glabra* ani *M. subaurifera* okrem kyseliny lekanorovej neobsahujú iné acetónom extrahovateľné metabolity. Oba druhy pokusných slimákov preferovali vymyté časti stielky *M. subaurifera* viac než nevymyté, u *M. glabra* to platí len v prípade *C. cerata*. Z výsledkov teda vyplýva, že kyselina lekanorová má antiherbivórne účinky, záleží však na konkrétnej kombinácii živočích – lišajník, pravdepodobne kvôli jej koncentrácii.

Kyselina salazinová je hlavnou medulárnou zložkou *P. sulcata* a *P. saxatilis*. Preukázateľne predlžuje larválne štádium *S. littoralis* (Giez et al. 2004). Ako som už spomenula vyššie, kŕmenie lariev *E. depressum* diskovkou *P. sulcata* spomaľuje ich rast – ale je otázne, ktorá látka je za to zodpovedná (Pöykkö et al. 2005). Taktiež má kyselina salazinová (v laboratórnych podmienkach) antibakteriálne účinky (Ranković et al. 2009). V mojich pokusoch rovnako ako v pokusoch Gauslaa (2005) vymytie metabolitov z oboch diskoviek rodu *Parmelia* významne zvýšilo konzumáciu slimákmi (*C. cerata* a *L. marginata* v mojich, *C. hortensis* v pokusoch Gauslaa). Obranná rola kyseliny salazinovej konkrétne je síce pravdepodobná, na základe výsledkov vykonaných pokusov sa však nedá potvrdiť.

Pigment skyrin (= rhodophycin), ktorý má podľa Nimis a Skert (2006) pravdepodobne antiherbivórne účinky voči *L. serricone*, sa vyskytuje v *M. glabratula*. Tá mala spomedzi skúmaných druhov najsilnejšiu ochranu. Môžeme len špekulovať, či k tomu prispieva práve skyrin alebo či je to dôsledkom vyššej koncentrácie kyseliny lekanorovej. Vyvodzovať závery o vplyve minoritných látok (kyseliny norstiktová, lobarová, lichesterinová, protolichesterinová, galbinová a nakoniec aj skyrin) nachádzajúcich sa v lišajníkoch, s ktorými som pracovala, však asi nie je na tomto mieste vhodné.

Všeobecne sa predpokladá, že funkciou kortikálnych látok je ochrana voči nadmernému žiareniu, kým funkciou medulárnych je hlavne ochrana proti herbivorom (Solhaug & Gauslaa 2012). Ak je to tak, je zaujímavé, prečo to v evolúcii dopadlo práve takto. Výhodnou stratégiou pre lišajník by predsa mohlo byť sústredenie všetkej obrany práve do vrchnej kôry. Tak by sa predátori odradili hneď pri prvom „zahryznutí“ a stielka by si ušetrila energiu potrebnú na regeneráciu vrchných vrstiev v prípade, že je obrana až na úrovni drene. Výsledky pokusov však naznačujú, že atranorin okrem toho, že vo vrchnej kôre chráni diskovky voči nadmernému žiareniu, odpudzuje aj slimáky.

Nakoniec je dôležité zdôrazniť, že slimáky, s ktorými boli pokusy uskutočnené, sa v prírode reálne živia aj epifytickými lišajníkmi. Za vlhkého počasia lezú vysoko na kmene stromov, *L. marginata* dokonca až do korún. A teda práve tieto druhy vytvárajú na lišajníky reálny predачný tlak. Môžeme teda prehlásiť, že sekundárne metabolity študovaných lišajníkov odpudzujú aj slimáky, ktoré sú na lišajníkovú stravu adaptované. Neodpuďujú ich však natoľko, aby sa stali nepríťažlivými alebo nejedlými, v prírode totiž často pozorujeme stopy

po spásaní aj na nich. Otázkou zostáva, aká by bola ich situácia, keby si ochranu vo forme sekundárnych metabolitov netvyvorili.

4.5 Index ochrany a preferencie

Vytvorený index ochrany mi aspoň teoreticky umožnil porovnávať medzi jednotlivými lišajníkmi aj slimákmi. Keďže hodnoty indexu pre oba druhy *Melanohalea* voči obom slimákom sa pohybovali okolo 0,5, považujem ho za vhodný. V prvom rade si môžeme všimnúť, že indexy sú celkovo voči *C. cerata* vyššie než voči *L. marginata*, teda okrem oboch *Melanohalea*. Napriek tomu, že len málo z párových porovnaní vyšlo štatisticky signifikantne, zdalo by sa možné vypozerovať niekoľko „skupín“. Tú prvú by tvorili *M. glabratula* a *P. tiliacea*, ktoré sú najlepšie chránené. Najslabšie chránené sú samozrejme *M. exasperata* a *M. exasperatula*. V pokusoch s *L. marginata* sa k nim pridáva aj *P. sulcata* a *M. glabra*, ktoré majú len veľmi slabú ochranu. *P. saxatilis* a *M. subaurifera* by predstavovali skupinu medzi tým. Pre *C. cerata* by prostrednú skupinu tvorili *M. subaurifera*, *M. glabra*, *P. saxatilis* a *P. sulcata*, aj keď tá posledná je chránená asi o niečo menej.

Bolo by zaujímavé pozrieť sa na to, ako by pokusy dopadli, ak by slimáky dostali na výber medzi druhmi. Znamenala by slabšia ochrana, že lišajník by bol preferovaný? Z priebehu pokusov by som predpokladala, že druhy bez metabolitov by rozhodne preferované boli. Ich konzumácia bola totiž najrýchlejšia. *L. marginata* v niekoľkých opakovaníach skonzumovala celé stielky už v priebehu prvých pár hodín pokusov. Boli by teda najlepšie chránené *M. glabratula* a *P. tiliacea* vyhľadávané najmenej? Odpoveď na túto otázku už nie je až taká jednoznačná. *M. glabratula* je podľa vypočítaného indexu voči obom slimákom chránené lepšie než napr. *P. sulcata* alebo *P. saxatilis*. Avšak z pokusov by sa zdalo, že celkovo je konzumovaná intenzívnejšie než ktorákoľvek testovaná *Parmelia*, rozdiel bol výraznejší u cihy *C. cerata*.

Na základe týchto úvah boli vybraté druhy na transplantačný pokus. *Melanohalea* mala predstavovať jasného favorita, *P. sulcata*, lišajník mierne až slabo chránený a *M. glabratula* mala byť druhom najlepšie chráneným, avšak s neistou domnienkou, že napriek tomu by mohla byť voči *P. sulcata* preferovaná.

4.6 Transplantačný pokus

Uskutočnený transplantačný pokus bol v stredoeurópskych podmienkach bukových lesov absolútne pilotný. Pokus Asplunda et al. (2010), ktorým bol inšpirovaný, sa uskutočnil v jaseňových lesoch SZ Nórska. Napriek tomu, že pri práci v teréne si môžu lichenológovia aj u nás všimnúť veľké množstvo stielok poškodených spásacmi, o skutočnej intenzite ich aktivity neexistovala reálna predstava. Bolo preto otázne ako pokus vôbec dopadne.

Zdá sa, že predačný tlak na lišajníky je na Muránskej planine dosť intenzívny, keďže spásanie bolo zaznamenané v relatívne veľkej miere na všetkých transplantovaných mriežkach (v priemere 35,3 % plochy lišajníkov na mriežke) a to za v podstate krátku dobu (112-114 dní). Je nutné poznamenať, že sa jedná o oblasť relatívne bohatú na epifyty, takže bezstavovce

hľadájúce si potravu na kmeňoch stromov jej tam mali dosť, t.j. mali na výber a pokusné mriežky pre ne nemohli predstavovať nečakane príťažlivý zdroj potravy.

Celkový obžer mriežok v pokuse bol najsilnejšie ovplyvnený lokalitou. Signifikantne najvyšší bol v doline Dolinského potoka. Dôležitým faktorom bol aj korunový zápoj, očakávala som však, že jeho vplyv bude významnejší. Korunový zápoj sa totiž dá chápať ako nepriamy ukazovateľ aktivity mäkkýšov – tam, kde sú koruny hustejšie, sa dlhšie udrží vlhkosť, ktorá je pre ne nevyhnutná. Nízka významnosť korunového zápoja môže byť v tomto prípade zapríčinená dvomi faktormi – tým prvým je fakt, že rozptyl hodnôt zápoja nebol veľký a väčšina mriežok na tom bola vlastne dosť podobne, takže jeho vplyv nemusí byť zjavný. Druhým dôvodom môže byť nepresnosť použitej techniky – odhadovanie zápoja pomocou sférického denziometra je relatívne hrubé a rozdiely spočívajúce v detailoch sa môžu strácať. Na druhej strane Asplund et al. (2010), ktorí k odhadu korunového zápoja používali oveľa citlivejšiu techniku (hemisferické fotografie a špeciálny program na ich analýzu), tiež žiadnu závislosť medzi ním a obžerom transplantov nezaznamenali. Práve vlhkosť je podľa mňa dôvodom najväčšej aktivity mäkkýšov na Dolinskom potoku – napriek tomu, že som ju nemerala, je v doline potoka určite vyššia než na ostatných dvoch lokalitách. Vlastnosti stromu, ďalší faktor o ktorom som predpokladala, že by mohol ovplyvniť aktivitu spásáčov (väčší strom náhodne nájde väčší počet živočíchov), sa neukázal ako významný. Pre priemer stromu môže opäť byť problémom malý rozptyl hodnôt, čo však nie je prípad báz.

4.7 Preferencie v transplantačnom pokuse

Preferencie medzi lišajníkmi boli zjavné. Podľa očakávaní bola výrazne preferovaná skupina *Melanohalea*, teda dva druhy bez metabolitov. Sú to druhy, ktoré prirodzene rastú na exponovanejších stanovištiach – na kmeňoch solitérnych stromov alebo na vetvičkách. Pred založením pokusu som preto uvažovala nad tým, či práve tieto dva druhy prežijú v zatienení bukových korún. V predbežných počiatočných laboratórnych pokusoch som pozorovala, že slimáky sa všeobecne odumretým stielkam (alebo ich častiam) vyhýbali. Preto ak by *Melanohalea* na transplantovaných mriežkach odumrela, mohlo by to výsledky pokusu výrazne skresľovať. To sa však nestalo, na 19 z 30 mriežok boli stielky *Melanohalea* skonzumované úplne. Aký záver by sa z toho dal vyvodiť? Buď sú stielky *M. exasperata* a *M. exasperatula* aspoň v obmedzenom časovom horizonte schopné prežiť aj na kmeňoch stromov v lese alebo boli pre slimáky také atraktívne, že zmizli ešte pred tým, než začali odumierať. (Ďalšou možnosťou by bolo, že predpoklad o tom, že sa vyhýbajú odumretým stielkam, je chybný.)

Ako som už spomenula, očakávania o preferenciách medzi *P. sulcata* a *M. glabratula* boli nejasné. *M. glabratula* má podľa výsledkov laboratórnych pokusov síce silnejšiu ochranu vo forme metabolitov, celkovo sa však javila „chutnejšia“. V transplantačnom pokuse nebola ani jedna viac preferovaná než druhá. Ak je teda chemická obrana *M. glabratula* účinnejšia než *P. sulcata*, zdá sa, že ochrana *P. sulcata* spočíva v inom, rovnako účinnom mechanizme. Zostáva otázkou, či by sa výsledok zmenil, ak by pokus trval kratšie.

Výsledok je v súlade s informáciami, ktoré som uviedla už v úvode a to, že sekundárne metabolity, napriek tomu, že lišajníkom poskytujú ochranu, nemusia vysvetľovať preferencie

medzi druhmi. To bol prípad napr. štyroch druhov *Lobaria* v transplantačnom pokuse Asplund et al. (2010). Reutiman & Scheidegger (1987) navrhli, že za výberom roztočov je okrem metabolitov aj štruktúra stielky a o tvrdosti povrchu ako dôvode rozdielneho spásania lišajníkov hovoria aj Fröberg et al. (2006). Práve táto hypotéza by sa mi zdala relevantná. Stielka *M. glabratula* je totiž celkovo jemnejšia než *P. sulcata*. Podobné štrukturálne rozdiely sa však len ťažko kvantifikujú. Hypotéza by mohla vysvetľovať aj to, prečo slimáky v laboratórnych pokusoch často vôbec nekonzumovali spodnú kôru – je to totiž najtvrdšia, najhustejšia vrstva stielky.

Ďalším faktorom, ktorý by mohol byť zodpovedný za preferencie medzi druhmi, je minerálne zloženie stielky. Ako som už spomenula v úvode, podľa Lawreyho „avoidance hypothesis“ (1983) sú preferencie ulitníka *P. varia* riadené práve sekundárnymi metabolitmi a nie obsahom N, P a Ca. Baur et al. (1994) však ukázali, že slimáky *B. perversa* a *C. clienta* preferujú tie druhy lišajníkov, ktoré umožňujú juvenilom najrýchlejšiu rast – a nie vždy sú to tie s najnižším obsahom sekundárných látok. Práve tu by sme teda odpoveď mohli hľadať v obsahu živín. Avšak preferencie oboch slimákov sa v ich štúdií značne líšili, preto treba počítať s druhovo-špecifickými schopnosťami vysporiadať sa s chemickou obranou ako aj využívať živinový a energetický obsah lišajníkov.

4.8 Ekologické dôsledky lichenofágie

Ako som už naznačila v úvode, lichenofágia ako jav môže mať významné ekologické dôsledky – od znižovania fitness jedinca cez obmedzovanie úspechu populácií až po limitáciu ekologickej niky alebo geografického rozšírenia druhu.

Okrem obmedzovania však spásaci prispievajú k rozširovaniu lišajníkov a to exo- (napr. Gerson 1973) ako aj endozoochórne (Boch et al. 2011). V exkrementoch roztočov sa našli životaschopné bunky fotobionta aj mykobionta *X. parietina* (Meier et al. 2002), v exkrementoch mäkkýšov bunky riasy *Trebouxia* z *X. parietina* (Fröberg et al. 2001) alebo celé fragmenty stielok *L. pulmonaria* a *P. adscendens* (Boch et al. 2011). Takáto forma rozširovania by mohla potenciálne byť pre lišajníky výhodnejšia než napr. anemochória. Týmto spôsobom je totiž pravdepodobné, že sa rozširované časti dostanú do podobného prostredia v akom rástla materská stielka a teda do prostredia vhodného na vývoj nového jedinca.

Ďalšou významnou funkciou lichenofágov v ekosystémoch je účasť na degradácii lišajníkov. McCune a Daly (1994) ukázali, že počas rozkladu epifytických lišajníkov (*Alectoria sarmentosa*, *Lobaria oregana*, *Hypogymnia inactiva*, *Platismatia glauca*) spadnutých na zem sa niekoľko násobne predĺži v prípade, že sa obmedzí prístup spásáčov väčších než 1 mm. Epifytické lišajníky, keďže pozostávajú z iného pomeru prvkov než cievnaté rastliny, pritom môžu byť významným zdrojom mikroprvkov v opade, ak sú v prostredí početné (Knops et al. 1991).

Ako vyplynulo z transplantačného pokusu, predačný tlak na lišajníky môže byť v podmienkach listnatých lesov mierneho pásma naozaj silný. Preto sa predpoklady o tom, že preferencie spásáčov ovplyvňujú ekológiu lišajníkov javia byť relevantné. Z použitých druhov

možeme o prípadných posunoch ekologickej niky v dôsledku predačného tlaku uvažovať pre rod *Melanohalea*. Ako som už spomenula, ten sa vyskytuje takmer výhradne na vetvičkách a solitérnych stromoch. Na týchto miestach je aktivita mäkkýšov nižšia. Dalo by sa teda špekulovať, že v dôsledku nedostatku chemickej obrany je rod vytlačený do týchto miest. Na druhej strane je možné uvažovať aj opačne – ak tieto lišajníky preferujú miesta s nízkym výskytom predátorov (napr. kvôli vyšším nárokom na svetlo), ochranu vo forme sekundárnych metabolitov si „nepotrebovali“ vyvinúť. Avšak aby sa tieto dohady potvrdili, bolo by potrebné zostaviť nový pokus s iným dizajnom.

Na záver, z uvedeného je zjavné, že ekológia lišajníkov je značne dynamickejšia než sa všeobecne predpokladá.

5. ZÁVER

S cieľom zodpovedať otázky súvisiace s preferenciami lichenofágov a ochrannou rolou sekundárnych metabolitov voči nim bola zostavená séria laboratórnych pokusov a transplantačný pokus.

Na laboratórne pokusy som použila osem epifytických lišajníkov – šesť tvoriacich sekundárne metabolity (*Parmelia sulcata*, *P. saxatilis*, *Parmelina tiliacea*, *Melanelixia glabratula*, *M. subaurifera*, *M. glabra*) a dva bez týchto látok (*Melanohalea exasperata*, *M. exasperatula*).

V prvom kroku som pomocou tenkovrstvej chromatografie zisťovala, aké látky sa v daných druhoch nazbieraných na území Muránskej planiny (SR) vyskytujú. Pre väčšinu druhov som potvrdila látky uvádzané v literatúre. V prípade *M. glabratula* sa nepodarilo nájsť kyselinu 5-metoxylekanorovú a v prípade *M. subaurifera* pigment subauriferin. Stielky *P. saxatilis* boli chemicky rôznorodé. Detekovala som v nich takmer všetky látky uvádzané v rôznych literárnych zdrojoch a našla dve ďalšie (kyseliny protolichesterinová a galabinová).

V laboratórnych pokusoch dostali dva druhy mäkkýšov (*Lehmannia marginata*, *Cochlodina cerata*) na výber medzi časťami stielky s prirodzeným obsahom lišajníkových látok a časťami, z ktorých boli metabolity pomocou acetónu extrahované. Ochranná rola metabolitov bola potvrdená u všetkých šiestich lišajníkov voči *C. cerata* a u štyroch aj voči *L. marginata*. *M. exasperata* a *M. exasperatula* poslúžili úspešná ako kontrola toho, že použitá metodika vymývania stielok acetónom sama o sebe neovplyvňuje príťažlivosť stielok.

Na základe výsledkov laboratórnych pokusov som na transplantačný pokus vybrala *P. sulcata*, *M. glabratula* a oba vyššie uvedené druhy rodu *Melanohalea*. Mriežky s týmito lišajníkmi boli pripevnené na 30 bukov v JV časti Muránskej planiny na dobu 112-114 dní. Spásanie bolo zaznamenané na všetkých mriežkach a to v relatívne vysokej miere (priemerne 35,3 % celkovej počiatočnej plochy lišajníkov na mriežke). Rod *Melanohalea* bol jednoznačne preferovaný najviac, medzi *P. sulcata* a *M. glabratula* nebol preukázateľný rozdiel. Pozorované preferencie sa obsahom sekundárnych metabolitov dajú vysvetliť len čiastočne. Ďalším dôležitým faktorom ovplyvňujúcim atraktivitu lišajníkov pre spásáčov môže byť napríklad štruktúra stielky.

Z dostupnej literatúry vyplýva, že mäkkýše môžu obmedzovať fitness jedincov alebo úspech populácií lišajníkov a dokonca aj ich geografické rozšírenie. Na druhej strane môžu byť vektorom ich rozširovania. Okrem toho sa podieľajú na degradácii stielok lišajníkov a tým sa stávajú dôležitou súčasťou kolbehu živín v ekosystémoch. Výsledky naznačujú, že prirodzení spásачi môžu limitovať realizovanú ekologickú nikú lišajníkov. Z diplomovej práce vyplýva, že lichenofágia nie je zanedbateľným javom ani v našich podmienkach a je potrebný ďalší výskum, ktorý by viedol k objasneniu týchto komplikovaných a zaujímavých vzťahov.

6. LITERATÚRA

- Adamo P., Marchetiello A. & Violante P. 1993. The weathering of mafic rocks by lichens. *Lichenologist* 25(3): 285-297.
- Arocena J. M., Zhu L. P. & Hall K. 2003. Mineral accumulations induced by biological activity on granitic rocks in Qinghai Plateau, China. *Earth Surface Processes and Landforms* 28: 1429-1437.
- Ascaso C., Galvan J. & Ortega C. 1976. The pedogenic action of *Parmelia conspersa*, *Rhizocarpon geographicum* and *Umbilicaria pustulata*. *Lichenologist* 8: 151-171.
- Ascaso C., Sancho L. G. & Rodriguez-Pascual C. 1990. The weathering action of saxicolous lichens in maritime Antarctica. *Polar Biology* 11: 33-39.
- Asplund J. 2011. Snails avoid the medulla of *Lobaria pulmonaria* and *L. scrobiculata* due to presence of secondary compounds. *Fungal Ecology* 4: 356-358.
- Asplund J. & Gauslaa Y. 2008. Mollusc grazing limits growth and early development of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in broadleaved deciduous forests. *Oecologia* 155: 93-99.
- Asplund J. & Gauslaa Y. 2010. The gastropod *Arion fuscus* prefers cyanobacterial to green algal parts of the tripartite lichen *Nephroma arcticum* due to low chemical defence. *Lichenologist* 42(1): 113-117.
- Asplund J., Larsson P., Vatne S. & Gauslaa Y. 2010. Gastropod grazing shapes the vertical distribution of epiphytic lichens in forest canopies. *Journal of Ecology* 98: 218-225.
- Asplund J., Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 2010a. Optimal defence: snails avoid reproductive parts of the lichen *Lobaria scrobiculata* due to internal defence allocation. *Ecology* 91(10): 3100-3105.
- Baur A., Baur B. & Fröberg L. 1994. Herbivory on calcicolous lichens: different food preferences and growth rates in two co-existing land snails. *Oecologia* 98(3/4): 313-319.
- Baur B. & Baur A. 1997. *Xanthoria parietina* as a food resource and shelter for the land snail *Balea perversa*. *Lichenologist* 29: 99-102.
- Baur B., Fröberg L., Baur A., Guggenheim R. & Haase M. 2000. Ultrastructure of snail grazing damage to calcicolous lichens. *Nordic Journal of Botany* 20(1): 119-128.
- Begon M., Harper J. L. & Townsend C. R. 1997. Ekologie – jedinci, populace a společenstva. Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, 949 str.
- Benesperi R. & Tretiach M. 2004. Differential land snail damage to selected species of the lichen genus *Peltigera*. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 127-138.
- Blanco O., Crespo A., Ree R. H. & Lumbsch H. T. 2006. Major clades of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) and the evolution of their morphological and chemical diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 52-69.
- Boch S., Prati D., Werth S., Rüetschi J. & Fischer M. 2011. Lichen endozoochory by snails. *Plos One* 6(4): e18770.
- Brown B. 2003-2005. Forestry GIS. University of Wisconsin, USA, <http://www.forestpal.com/fgis.html>
- Catalán T. P., Ladries M. A. & Bozinovic F. 2008. Food selection and nutritional ecology of woodlice in Central Chile. *Physiological Entomology* 33: 89-94.

- Culberson C. F. 1969. Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. The University of North Carolina Press, 628 str.
- Culberson C. F. 1972: Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography* 72: 113-125.
- Crespo A., Kauff F., Divakar P. K., del Prado R., Pérez-Ortega S., Amo de Paz G., Ferencova Z., Blanco O., Roca-Valiente B., Núñez-Zapata J., Cubas P., Argüello A., Elix J. A., Esslinger T. L., Hawksworth D. L., Millanes A., Molina M. C., Wedin M., Ahti T., Aptroot A., Barreno E., Bungartz F., Calvelo S., Candan M., Cole M., Ertz D., Goffinet B., Lindblom L., Lücking R., Lutzoni F., Mattsson J. E., Messuti M. I., Miadlikowska J., Piercey-Normore M., Rico V. J., Sipman H. J. M., Schmitt I., Spribille T., Thell A., Thor G., Upreti D. K. & Lumbsch H. T. 2010. Phylogenetic generic classification of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota) based on molecular, morphological and chemical evidence. *Taxon* 59 (6): 1735-1753.
- Elix J. A. & Stocker-Wörgötter E. 2008. Biochemistry and secondary metabolites. In: Nash III T.H. (ed) *Lichen Biology*. Cambridge University Press, 104-133.
- Elix J. A. & Vilas K. J. 2003. 5-Methoxylecanoric acid, a new depside from *Melanelia glabratula*. *Australasian Lichenology* 53: 10-13.
- Emmerich R., Giez I. Lange O. L. & Proksch P. 1993. Toxicity and antifeedant activity of lichen compounds against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Phytochemistry* 33(6): 1389-1394.
- Fröberg L., Baur A. & Baur B. 2006. Field study on regenerative capacity of three calcicolous lichen species damaged by snail grazing. *Lichenologist* 38(5): 491-493.
- Fröberg L., Björn L. O., Baur A. & Baur B. 2001. Viability of lichen photobionts after passing through the digestive tract of a land snail. *Lichenologist* 33(6): 543-550.
- Fröberg L., Stoll P., Baur A. & Baur B. 2011. Snail herbivory decreases cyanobacterial abundance and lichen diversity along cracks of limestone pavements. *Ecosphere* 2(3): 1-43.
- Gardner C. R. & Mueller D. M. J. 1981. Factors affecting the toxicity of several lichen acids: effect of pH and lichen acid concentration. *American Journal of Botany* 68(1): 87-95.
- Garmin Ltd. or its subsidiaries 1999-2009. MapSource 6.15.7.
- Gauslaa Y. 2005. Lichen palatability depends on investments in herbivore defence. *Oecologia* 143: 94-105.
- Gauslaa Y. 2008. Molluscs grazing may constrain the ecological niche of the old forest lichen *Pseudocyphellaria crocata*. *Plant Biology* 10: 711-717.
- Gerson U. 1973. Lichen – arthropod associations. *Lichenologist* 5: 434-443.
- Gerson U. & Seaward M. R. D. 1977. Lichen-invertebrate associations. In: Seaward M. R. D. 1977. *Lichen Ecology*. Academic Press Inc. London Ltd., 69-120.
- Giez I., Lange O. L. & Proksch P. 1994. Growth retarding activity of lichen substances against the polyphagous herbivorous insect *Spodoptera littoralis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 22(2): 113-120.
- Goel M., Dureja P., Rani A., Uniyal P. L. & Laatsch H. 2011. Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan Lichen *Parmelia reticulata* Tayl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(6): 2299-2307.

- Hanley M. E., Bulling M. T. & Fenner M. 2003. Quantifying individual feeding variability: implications for molluscs feeding experiments. *Functional Ecology* 17: 673-679.
- Hebacher S., Fröberg L., Baur A., Baur B. & Proksch P. 1996. Chemical variation within and between individuals of the lichenized ascomycete *Tephromela atra*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24(7/8): 603-609.
- Henningsson B. & Lundström H. 1970. The influence of lichens, lichen extracts and usnic acid on wood destroying fungi. *Material und Organismen* 5: 19-31.
- Honegger R. 2003. The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming Ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5: 324-330.
- Huneck S. 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86: 559-570.
- Huneck S. & Yoshimura I. 1996. Identification of lichen substances. Springer, Berlin. 493 str.
- Hyvärinen M., Koompan R., Hormi O. & Tuomi J. 2000. Phenols in reproductive and somatic structures of lichens: a case of optimal defence? *Oikos* 91: 371-375.
- Iskanaar I. K. & Syers J. K. 1971. Solubility of lichen compounds in water: pedogenic implications. *Lichenologist* 5: 45-50.
- Kerney M. P., Cameron R. A. D. & Jungbluth J. H. 1983. Die Landschencken Nord- und Mitteleuropaopas. Paul Parey, 384 str.
- Kinraide W. T. B. & Ahmadjian V. 1970. The effects of usnic acid on the physiology of two cultured species of the lichen alga *Trebouxia* Puym. *Lichenologist* 4: 234-247.
- Kirkpatrick R. C., Zou R. J., Dierenfeld E. S. & Zhou H. W. 2001. Digestion of selected foods by Yunnan snub-nosed monkey *Rhinopithecus bieti* (Colobinae). *American Journal of Physical Anthropology* 114: 156-162.
- Knops J. M. H., Nash III T. H., Boucher V. L. & Schlesinger W. H. 1991. Mineral cycling and epiphytic lichens: implications at the ecosystem level. *Lichenologist* 23(3): 309-321.
- Krebs C. J. 1999. Ecological Methodology. Addison Wesley Longman, Inc, 2nd edition, 624 str.
- Land C. J. & Lundström H. 1998. Inhibition of fungal growth by water extracts from the lichen *Nephroma arcticum*. *Lichenologist* 30(3): 259-262.
- Lange O. L., Green T. G. A., Reichenberger H., Hesbacher S. & Proksch P. 1997. Do secondary substances in the thallus of a lichen promote CO₂ diffusion and prevent depression of net photosynthesis at high water content? *Oecologia* 112: 1-3.
- Lawrey J. D. 1977. Inhibition of moss spore germination by acetone extracts of terricolous *Cladonia* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 104(1): 49-52.
- Lawrey J. D. 1983. Lichen Herbivore Preference: A Test of Two Hypotheses. *American Journal of Botany* 70(8): 1188-1194.
- Lawrey J. D. 1986. Biological role of lichen substances. *The Bryologist* 89(2): 111-122.
- Lawrey J. D. 1997. Isolation, culture, and degradative behavior of the lichen parasite *Hobsonia santessonii*. *Symbiosis* 23(2+3): 107-116.
- Lemmon P. E. 1957. A new instrument for measuring forest overstory density. *Journal of Forestry* 55(9): 667-668.
- Ložek V. 1956. Klíč československých měkkýšů. Vydavatel'stvo SAV, Bratislava, 437 str.

- Luo H., Yamamoto Y., Kim J. A. Jung J. S., Koh Y. J. & Hur J.-S. 2009. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology* 32: 1033-1040.
- Lücking R. & Bernecker-Lücking A. 2000. Lichen feeders and lichenicolous fungi: do they affect dispersal and diversity in tropical foliicolous lichen communities? *Ecotropica* 6: 23-41.
- McCune B. & Daly W. J. 1994. Consumption and decomposition of lichen litter in a temperate coniferous rainforest. *Lichenologist* 26 (1): 67-71.
- McEvoy M., Nybakken L., Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 2006. UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. *Mycological Progress* 5: 221-229.
- McKey D. 1974. Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. *The American Naturalist* 108 (961): 305-320.
- Morrison D. F. 1990. *Multivariate Statistical Methods*. McGraw-Hill, New York.
- Neeraj V., Behera B. C., Parizadeh H. & Sharma B. O. 2011. Bactericidal activity of some lichen secondary compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* & *Parmotrema sancti-angelii*. *International Journal of Drug Development & Research* 3(3): 222-232.
- Nybakken L., Asplund J., Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 2007. Forest successional stage affects the cortical secondary chemistry of three old forest lichens. *Journal of Chemical Ecology* 33: 1607-1618.
- Nybakken L., Hølmersén A. M., Gauslaa Y. & Selås V. 2010. Lichen compounds restrain feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *Journal of Chemical Ecology* 36: 298-304.
- Nybakken L. & Julkunen-Tiitto R. 2006. UV-B induces usnic acid in reindeer lichens. *Lichenologist* 38(5): 477-485.
- Orange A., James P. W. & White F. J. 2010. *Microchemical methods for the identification of lichens*. British Lichen Society, 101 str.
- Pfleger V. 1988. Měkkýši. Atria, Praha, 191 str.
- Pöykkö H. & Hyvärinen M. 2003. Host preference and performance of lichenivorous *Eilema* spp. larvae in relation to lichen secondary metabolites. *Journal of Animal Ecology* 72(3): 383-390.
- Pöykkö H., Hyvärinen M. & Bačkor M. 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. *Ecology* 86(10): 2623-2632.
- R Development Core Team 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.
- Rasband, W.S. 1997-2012. *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Ranković B., Mišić M. & Sukdolac S. 2009. Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biologia* 64(1): 53-58.

- Reutiman P. & Scheidegger C. 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (Acari) in an alpine meadow ecosystem. *Journal of Chemical Ecology* 13(2): 363-369.
- Richardson D. H. S. & Young C. M. 1977. Lichens and vertebrates. In: Seaward M. R. D. 1977. *Lichen Ecology*. Academic Press Inc. London Ltd., 121-144.
- Sanchez J. A., Gillespie D. R. & McGregor R. R. 2004. Plant preference in relation to life history traits in the zoophytophagous predator *Dicyphus hesperus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 112: 7-19.
- Scheidegger C. 1995. Early development of transplanted isidioid soredia of *Lobaria pulmonaria* in an endangered population. *Lichenologist* 27(5): 361-374.
- Schmidt V. & Schaefer H. M. 2004. Unlearned preference for red may facilitate recognition of palatable food in young omnivorous birds. *Evolutionary Ecology Research* 6: 919-925.
- Smith C. W., Aptroot A., Coppins B. J., Fletcher A., Gilbert O. L., James P. W. & Wolseley P. A. (ed.) 2009. *The Lichens of Great Britain and Ireland*. The British Lichen Society, London, 1046 str.
- Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 1996. Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108: 412-418.
- Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 2001. Acetone rinsing – A method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. *Symbiosis* 30: 301-315.
- Solhaug K. A. & Gauslaa Y. 2012. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. *Progress in Botany* 73: 283-304.
- Solhaug K. A., Laarson P. & Gauslaa Y. 2010. Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Flora* 231: 1003-1011.
- Solhaug K. A., Lind M., Nybakken L. & Gauslaa Y. 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora* 204: 40-48.
- Souza-Egipsy V., Valladares F. & Ascaso C. 2000. Water distribution in foliose lichen species: Interactions between method of hydration, lichen substances and thallus anatomy. *Annals of Botany* 86: 595-601.
- Speiser B. 2001. Food and feeding behaviour. In: Baker G. M. (ed) *The biology of terrestrial molluscs*. CABI Publishing, 259-288.
- Stahl E. 1904. *Die Schutzmittel der Flechten gegen Tierfrass*. Festschrift zum siebzigsten Geburtstage von Ernst Haeckel. Jena.
- Stark S. & Hyvärinen M. 2003. Are phenolics leaching from the lichen *Cladina stellaris* sources of energy rather than allelopathic agents for soil microorganisms? *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1381-1385.
- Stickler G. S. 1959. Use of the densiometer to estimate density of forest canopy on permanent sample plots. *Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station Research Notes* 180:1-5.
- Thell A. & Moberg R. 2011. *Nordic Lichen Flora*. Volume 4. Parmeliaceae. Museum of Evolution, Uppsala University, Uppsala, 184 str.

- Vatne S., Solhøy T., Asplund J. & Gauslaa Y. 2010. Grazing damage in the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* increases with gastropod abundance in deciduous forests. *Lichenologist* 42: 615-619.
- Vicetne C., Azpiroz A., Estévez M. P. & González M. L. 1978. Quaternary structure changes and kinetics of urease inactivation by L-usnic acid in relation to the regulation of nutrient transfer between lichen symbionts. *Plant, Cell and Environment* 1: 29-33.
- Votintseva A. A. 2007. Interspecific interactions of wood-decomposing fungi with epiphytic lichens and mosses. *Russian Journal of Ecology* 38(4): 285-288.
- Whiton J. C. & Lawrey J. D. 1982. Inhibition of *Cladonia cristatella* and *Sordaria fimicola* ascospore germination by lichen acids. *The Bryologist* 85(2): 222-226.
- Whiton J. C. & Lawrey J. D. 1984. Inhibition of crustose lichen spore germination by lichen acids. *Bryologist* 87(1): 42-43.
- Williams M. E. & Rudolph E. D. 1974. The role of lichens and associated fungi in the chemical weathering of rock. *Mycologia* 66(4): 648-660.
- Wirth V. 1995. Die Flechten Baden-Württembergs. Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart, 1006 str.
- Zopf W. 1896. Zur biologischen Bedeutung der Flechtensäuren. *Biol. Centralbl.* 16: 593-610.
- Zúbrik M., Kunca A. & Novotný J. 2008. Hmyz a huby: atlas poškodení lesných drevín. Národné lesnícke centrum – Lesnícky výskumný ústav, Zvolen, 178 str.
- Zukal H. 1895. Morphologische und biologische Untersuchungen über die Flechten. *Anzeiger der Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse* 104: 1303-1395.

7. PRÍLOHY

7.1 Laboratórne pokusy s *L. marginata*: primárne dáta

7.2 Laboratórne pokusy s *C. cerata*: primárne dáta

7.3 Transplantačný pokus: primárne dáta